

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



Diplomová práce

**Stanovení kobaltnatých iontů v SIA systému s
chemiluminiscenční detekcí**

Erik Kőszegy

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2013

Prehlásenie

Prehlasujem, že túto diplomovú prácu som vypracoval samostatne za použitia prameňov uvedených v zozname literatúry a že tato práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové dňa:

Na úvod svojej diplomovej práce by som sa chcel poďakovať všetkým, ktorí ma podporovali a pomáhali mi pri jej vypracovávaní, najmä vedúcej tejto diplomovej práce doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D., za jej trpezlivosť a odborné konzultácie pri spracovávaní. Tiež by som sa chcel poďakovať rodičom za ich podporu pri štúdiu.

Erik Kőszegy

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Erik Kőszegy

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Názov diplomovej práce:

Stanovení kobaltnatých iontů v SIA systému s chemiluminiscenční detekcí

V tejto práci bola použitá metóda sekvenčnej injekčnej analýzy na stanovenie kobaltnatých iónov s chemiluminiscenčnou detekciou.

Základom stanovenia je chemiluminiscenčná reakcia, ktorej podstatou je oxidácia luminolu peroxidom vodíka v prietokovom systéme za prítomnosti kobaltnatých iónov v alkalickom prostredí. Stopové množstvá kobaltnatých iónov fungujú v reakcii ako katalyzátor chemickej reakcie.

Použitá aparatura pozostávala z klasického SIA systému s prietokovou celou tvorenou špirálou z priehľadnej teflónovej hadičky, ktorá je vhodná na chemiluminiscenčné meranie. Emitované žiarenie bolo detekované pomocou citlivého fotonásobiča.

Reakcia bola prevedená v systéme po predchádzajúcej optimalizácii reakčných podmienok. Ďalej bola zisťovaná citlivosť a opakovateľnosť chemiluminiscenčnej reakcie.

Pri stanovení kalibračnej závislosti bol použitý roztok peroxidu vodíka, luminolu v 0,1 M NaOH a roztok vzorky, ktorý obsahoval kobaltnaté ióny v odstupňovanej koncentrácii od 1 mM do 0,001 mM. Optimálne koncentrácie činidiel boli 5 mM pre luminol v 0,1 M roztoku NaOH a 5 mM pre peroxid vodíka. Optimálna prietoková rýchlosť bola 127 $\mu\text{l/s}$. Na konci bola premeraná opakovateľnosť s relatívnou smerodajnou odchýlkou $\text{RSD} = 2,45\%$ pre koncentráciu 0,01 mM Co a 4,5% pre koncentráciu 0,1 mM Co.

Použitá metóda je rýchla, jednoduchá a finančne nenáročná, preto môže byť užitočná pri rutínnej analýze prírodných a odpadových vôd.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Erik Kőszegy

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis:

Determination of Co (II) ions in the SIA system with chemiluminescence detection

The thesis deals with the determination of cobalt(II) ions using the sequential injection analysis technique with chemiluminescence detection.

The chemiluminescent reaction based on luminol oxidation by hydrogen peroxide a flow-through system in the presence of cobalt(II) ions in an alkaline solution serves as the basis for the determination. Trace amounts of cobalt(II) ions act as a catalyst in the chemical reaction.

Apparatus used, consists of a standard SIA system with a flow-through cell formed by a transparent Teflon coil tube, which is suitable for conducting chemiluminescent measurements. Emitted radiation was detected using a sensitive photomultiplier.

The reaction was carried out in the system following an optimization of reaction conditions. The sensitivity and repeatability of the chemiluminescence reaction was subsequently examined.

To determine the calibration dependence a solution of hydrogen peroxide and luminol in 0.1 M NaOH and a solution of the sample containing cobalt(II) ions in graded concentrations of 1 mM to 0.001 mM was used. Optimum concentrations of reagents were 5 mM for luminol in 0.1 M NaOH solution and 5 mM for hydrogen peroxide. The optimum flow rate was 127 $\mu\text{l/s}$. Repeatability measured at the end of the experiment showed the relative standard deviation $\text{RSD} = 2.45\%$ for 0.01 mM Co(II) concentration and 4.5% for a concentration of 0.1 mM Co(II).

The method described is fast, simple and financially efficient, which makes it potentially useful for routine analysis of natural and waste waters.

Obsah

1	Úvod	9
2	Cieľ a popis zadania práce	12
3	Teoretická časť	14
3.1	Chemiluminiscencia	15
3.2	Reakčný mechanizmus oxidácie luminolu	16
3.3	Metódy prietokovej analýzy	17
3.4	Kontinuálna prietoková analýza (CFA)	18
3.5	Segmentovaná prietoková analýza (SFA)	19
3.6	Prietoková injekčná analýza (FIA).....	19
3.7	Sekvenčná injekčná analýza (SIA).....	20
3.7.1	Charakteristika SIA.....	20
3.7.2	Príslušenstvo SIA.....	22
3.8	Sekvenčná injekčná chromatografia (SIC)	24
3.9	Bead Injection	25
4	Experimentálna časť	27
4.1	Materiál.....	28
4.1.1	Použité chemikálie	28
4.1.2	Príprava roztokov	28
4.1.3	Príprava zásobných roztokov.....	28
4.1.4	Kalibračné roztoky	29
4.2	Použité prístroje	30
4.3	Pracovný postup.....	30
4.3.1	Optimalizácia podmienok v systéme SIA	30
4.3.2	Optimalizácia sekvencie aspirovaných zón.....	31

4.3.3	Optimalizácia prietokovej rýchlosti detektorom.....	33
4.3.4	Optimalizácia koncentrácie činidiel.....	34
4.3.5	Optimalizácia objemu činidiel a prietokovej rýchlosti	35
4.3.6	Kalibračná závislosť.....	35
4.3.7	Opakovateľnosť	36
5	Výsledky	37
5.1	Optimalizácia sekvencie aspirovaných zón.....	38
5.1.1	Optimalizácia sekvencie pre železité ióny	38
5.1.2	Optimalizácia sekvencie pre kobaltnaté ióny	40
5.2	Optimalizácia prietokovej rýchlosti detektorom.....	42
5.2.1	Optimalizácia prietokovej rýchlosti so železitými iónmi.....	42
5.2.2	Optimalizácia prietokovej rýchlosti s kobaltnatými iónmi	43
5.3	Optimalizácia koncentrácie činidiel	45
5.3.1	Optimalizácia koncentrácie peroxid vodíka	45
5.3.2	Optimalizácia koncentrácie luminolu.....	46
5.4	Optimalizácia objemu činidiel a prietokovej rýchlosti.....	48
5.4.1	Optimalizácia č. 1	48
5.4.2	Optimalizácia č. 2	49
5.4.3	Optimalizácia č. 3	50
5.5	Kalibračná závislosť.....	53
5.6	Opakovateľnosť	55
6	Zhrnutie.....	58
7	Záver	61
8	Použitá literatúra.....	63

Zoznam použitých skratiek

BI	nástrek častice (bead injection)
BI – LOV	nástrek častice na Lab-on-valve module (bead injection – Lab on valve)
CE	kapilárna elektroforéza
CFA	kontinuálna prietoková analýza
CL	chemiluminiscencia
Co	kobalt
Fe	železo
FIA	prietoková injekčná analýza
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
ITP	isotachoforéza
LC	kvapalinová chromatografia
Mn	mangán
Pb	olovo
RSD	relatívna smerodajná odchýlka udávaná v %
SFA	segmentovaná prietoková analýza
SIA	sekvenční injekční analýza
SIC	sekvenčná injekčná chromatografia
UV	ultrafialová oblasť žiarenia

1 . Úvod

Táto diplomová práca popisuje stanovenie kobaltnatých iónov pomocou metódy sekvenčnej injekčnej analýzy (SIA). Metóda bola pre tento zámer použitá najmä kvôli možnosti automatického spracovávanía vzoriek, vysokej rýchlosti merania a nízkej spotreby použitých činidiel.

Stanovenie je založené na chemiluminiscenčnej reakcii, pri ktorej dochádza k oxidácii luminolu peroxidom vodíka v prietokovom systéme za katalýzy kobaltnatých iónov. Luminol je látka, ktorá má vlastnosť chemickej luminiscencie, pokiaľ je zmiešaná s vhodným oxidačným činidlom. Ako oxidačné činidlo bol použitý peroxid vodíka, ktorý sa bežne používa v reakcii s luminolom v chemiluminiscenčných systémoch. Vplyvom chemickej reakcie medzi luminolom a peroxidom vodíka dochádza k emisii svetelného žiarenia, ktoré je vyžarované vo forme modrého svetla. Toto žiarenie je priamo úmerné koncentrácii kobaltnatých iónov vo vzorke.

Z dôvodu možných toxických vplyvov kobaltu na ľudský organizmus je potrebné monitorovať jeho koncentrácie v pitnej vode a životnom prostredí. Vo všeobecnosti platí, že koncentrácie kobaltu sú v urbanizovaných regiónoch vyššie ako v riedko zaľudnených oblastiach. Hladiny kobaltu v povrchových vodách sú nízke, dosahujú hodnoty pod 1 µg/l, v pitnej vode sú nižšie ako 1-2 µg/l (1). Napriek tomu, že podľa niektorých štúdií môžu zvýšené hladiny kobaltu zvyšovať riziko vzniku rakoviny, zatiaľ nie je klasifikovaný medzi kancerogénnymi látkami (2).

Kobaltnaté ióny sa prirodzene nachádzajú v stopových množstvách v pôde a vo vode. Z pôdy sa môže dostať do rastlín a podzemných vôd. Hoci patrí medzi esenciálne minerály, ľudské telo ho potrebuje len v malom množstve. Ľudia sú neustále vystavovaní malým množstvám kobaltu zo vzduchu, z vody alebo z potravy. Ako esenciálny biochemický prvok, kobalt je skladovaný hlavne v červených krvinkách a v menšom množstve v obličkách, pečeni, plazme, slezine a pankrease (3).

Stopové množstvá kobaltu sú nevyhnutné pre zachovanie dobrého zdravia. Kobalt je dôležitou zložkou vitamínu B₁₂, zvyšuje efektivitu glukózového transportu z krvi do buniek, zvyšuje absorpciu železa a tvorbu červených krviniek. Môže aktivovať mnoho enzýmov v ľudskom tele, normalizovať činnosť buniek a v niektorých enzýmoch nahradzovať funkciu zinku (4).

Popísaný systém nachádza uplatnenie nielen pri stanovovaní a detekcii Co, ale aj iónov iných ťažkých kovov, ktoré majú schopnosť katalyzovať danú chemiluminiscenčnú reakciu. Medzi takéto ióny patrí napríklad Pb, Mn(II) alebo Fe(III).

2 . Ciel' a popis zadania práce

Cieľom tejto diplomovej práce je stanovenie vplyvu kobaltnatých iónov na chemiluminiscenčný systém s použitím luminolu a peroxidu vodíka pomocou systému SIA, optimalizácia podmienok pre stanovenie kobaltnatých iónov a prevedenie reakcie v prietokovom systéme.

Účelom optimalizácie bolo vymedziť čo najideálnejšie podmienky pre stanovenie kobaltnatých iónov.

Prvý krok zahŕňal nastavenie citlivosti detektoru a optimalizovanie parametrov chemickej reakcie, to znamená koncentrácie jednotlivých zložiek, sekvencia aspirovaných zón, rýchlosť prietoku a objemy použitých činidiel. V druhom kroku bolo vykonané kalibračné meranie a stanovenie kalibračnej závislosti s využitím parametrov získaných pri optimalizácii. Nakoniec bola testovaná opakovateľnosť meraní a stanovená relatívna smerodajná odchýlka.

3 . Teoretická část'

3.1 Chemiluminiscencia

Luminiscencia je pojem používaný pre popis emitovaného žiarenia, ktoré uvoľňuje molekula pri svojom prechode z excitovaného do základného stavu. V závislosti na zdroji získavania budiacej energie pre prechod molekuly do excitovaného stavu rozlišujeme niekoľko druhov luminiscencie (viď tabuľka 1) (5).

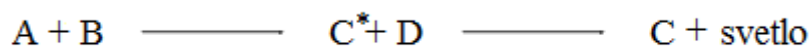
Tab. 1 Rozdelenie luminiscencie podľa typu budiacej energie (5)

Druh luminiscencie	Budiaca energia
Rádioluminiscencia	krátkovlnné elektromagnetické žiarenie – napr. γ , röntgenové atd.
Termoluminiscencia	Tepelná
Elektroluminiscencia	Elektrická
Katódová luminiscencia	elektróny urychlené v elektrickom poli
Triboluminiscencia	mechanická – trenie, stlačovanie a pod.
Chemoluminiscencia	chemická reakčná
Fotoluminiscencia	svetelné žiarenie, popr. UV žiarenie
Sonoluminiscencia	Ultrazvuk

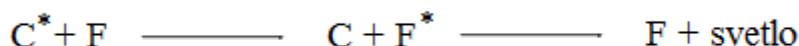
Pojem chemiluminiscencia (CL) bol prvýkrát použitý nemeckým fyzikom Eilhardom Weidemannom v roku 1888 (6) a vyjadruje vyžarovanie elektromagnetického žiarenia vo forme svetla, ktoré vzniká uvoľnením energie z chemickej reakcie. Vo všeobecnosti môže byť svetlo emitované vo viditeľnej, ultrafialovej a infračervenej oblasti. Reakcie, ktoré emitujú svetlo vo viditeľnej oblasti sú najbežnejšie a v praxi aj najviac používané (7).

CL je jav pozorovaný, keď sa vibračne excitovaný produkt exoergickej reakcie dostáva do svojho základného stavu, pričom sa uvoľňuje energia formou emisie fotónov. Chemická reakcia produkuje energiu v dostatočnom množstve na to, aby došlo k indukcii prechodu elektrónu zo základného do excitovaného stavu. Pri emisii modrého svetla je to približne 300 kJ mol^{-1} , pri emisii červeného svetla 150 kJ mol^{-1} . Tento elektrónový prechod je často doprevádzaný rotačnými alebo vibračnými zmenami v molekule. Návrat elektrónu z menej stabilného excitovaného stavu do stabilnejšieho základného stavu sprevádzaný emisiou fotónu je charakteristický pre chemiluminiscenciu (8) (9).

V súčasnosti je známych mnoho anorganických a organických CL reakcií. Typická CL reakcia by bola



kde (*) označuje elektrónovo excitovaný stav. Excitovaný produkt C* pri prechode do základného stavu emituje energiu formou fotónov. Tento produkt je neefektívny emitör, môže však svoju excitačnú energiu preniesť na vhodný flourofor pridaný do systému:

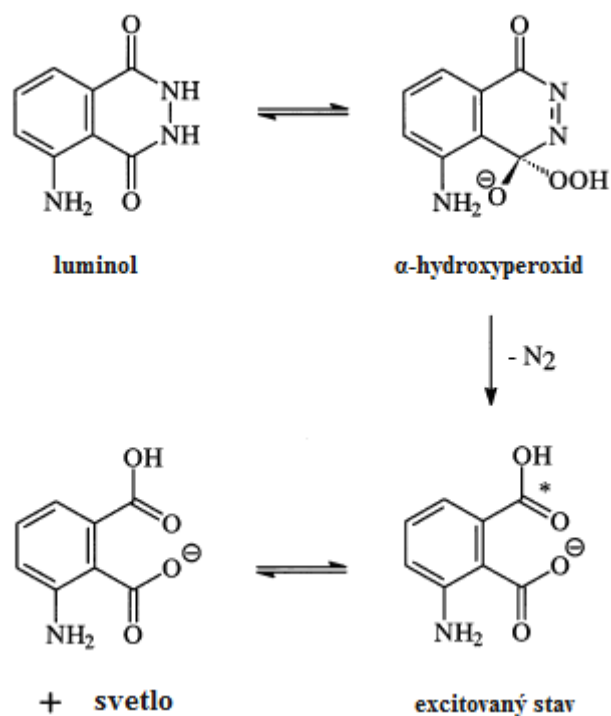


Flourofor potom prechádza z excitovaného stavu do základného, pričom dochádza k emisii fotónov. Takýto typ chemiluminiscencie môžeme označiť za nepriamy (10).

Z analytického hľadiska sú CL reakcie atraktívne vďaka výbornej citlivosti, nízkym detekčným limitom, často vysokej selektivite kvôli obmedzenému počtu dostupných reakcií a pritom jednoduchej a finančne nenáročnej inštrumentácii vhodnej tak ako pre batch techniku, tak aj pre ostatné prietokové metódy. Navyše, zavedenie prietokových metód ešte viac zvýšilo praktické využitie chemiluminiscencie, pretože umožňujú rýchle premiešanie roztoku vzorky a činidla s vysokou opakovateľnosťou (11).

3.2 Reakčný mechanizmus oxidácie luminolu

Najbežnejšou CL látkou používanou vo vodných roztokoch je luminol. Chemiluminiscencia luminolu (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion) bola prvýkrát popísaná Albrechtom v roku 1928 (12). Táto látka reaguje so silným oxidačným činidlom v prítomnosti katalyzátoru v alkalickom prostredí. Kľúčový je medziprodukt alfa- hydroxyperoxid získaný oxidáciou heterocyklického kruhu. Jeho rozpad vedie k vzniku 3-aminoftalátu, pričom dochádza k emisii svetla (8) (13).



Obrázok 1 Zjednodušený reakčný mechanizmus oxidácie luminolu (8)

Rozpadový model tohto medziproduktu, ktorý vedie k excitovanému stavu a následnej emisii svetla je unikátny a závisí výhradne na pH systému. V aprotickom rozpúšťadle (dimetylsulfoxid, dimetylformamid) dôjde k vzniku chemiluminiscencie len použitím silnej báze alebo kyslíku. V protickom rozpúšťadle (voda, zmesi s vodou, nižšie alkoholy) môžu luminol oxidovať rôzne kyslíkové deriváty (molekulárny kyslík, peroxidy, superoxidový anión), podmienkou je však prítomnosť buď enzýmového, alebo minerálneho katalyzátoru (8).

Zjavné použitie tejto reakcie tkvie v možnosti stanovovať oxidačné činidlá alebo zlúčeniny s nimi reagujúce. Tiež je ňou možné stanovovať ióny ťažkých kovov ich katalýzou CL reakcie alebo produkty enzýmovo-katalyzovaných reakcií (10).

3.3 Metódy prietokovej analýzy

Metódy prietokovej analýzy sú analytické systémy, ktoré sa vyznačujú tým, že sa v nich všetky operácie spojené s predbežnou úpravou a detekciou vzoriek odohrávajú v toku prúdiacej kvapaliny. Sú charakteristické predovšetkým vysokou rýchlosťou

merania a možnosťou automatizácie analytického postupu. To umožňuje používanie veľmi malých objemov vzoriek [<100 µl], čím sa docieli vysoká úspora použitých činidiel. Dávkovanie roztokov prebieha automaticky, čo dovoľuje analyzovať veľké množstvo vzoriek v krátkom čase. Meranie v uzatvorenom systéme eliminuje riziko kontaktu s toxickými látkami a kontaminácie vzoriek (14) (15).

Postupom času nadobudli prietokové systémy mnoho technických modifikácií, ktoré sú charakteristické rýchlym priebehom analytického merania, automatizáciou laboratórnych úkonov, miniaturizáciou prístrojového vybavenia a nízkou ekonomickou náročnosťou. Vďaka nízkym finančným nákladom a bez nutnosti veľkých prístrojových investícií môžu byť tieto systémy súčasťou takmer každého analytického laboratória (16).

Medzi najznámejšie modifikácie prietokových metód patria:

1. Kontinuálna prietoková analýza – Continuous flow analysis (CFA)
2. Segmentovaná prietoková analýza – Segmented flow analysis (SFA)
3. Prietoková injekčná analýza – Flow injection analysis (FIA)
4. Sekvenčná injekčná analýza – Sequential injection analysis (SIA)
5. Sekvenčná injekčná chromatografia – Sequential injection chromatography (SIC)
6. Miniaturizovaná sekvenčná injekčná chromatografia – Bead injection – lab on valve (BI – LOV)

3.4 Kontinuálna prietoková analýza (CFA)

Metóda kontinuálnej prietokovej analýzy bola zavedená Skeggsom v roku 1957 (17) a vzťahuje sa k akémukoľvek procesu, pri ktorom je koncentrácia analytu zisťovaná neprerušovane v prúde kvapaliny alebo plynu. Roztoky vzoriek a činidiel sú kontinuálne privádzané peristaltickou pumpou do systému, kde dochádza k ich zmiešaniu. K premiešaniu vzoriek a činidiel dochádza v reakčnej cievke v závislosti na turbulentnom prúdení. Po ukončení reakcie, teda v ustálenom stave, vzorka vstupuje do

detekčnej cely detektoru. Odtiaľ smeruje vzorka buď do odpadu (otvorený systém), alebo je recirkulovaná (uzatvorený systém) (18).

Techniky CFA a FIA sú podobné, ale líšia sa však v určitých experimentálnych aspektoch. Pri metóde FIA sa vzorky vstrekujú do nesegmentovaného prúdu nosnej kvapaliny, miešajú sa s činidlami a vstupujú do detekčnej cely pred ukončením reakcie medzi vzorkou a činidlami, to znamená v neustálenom stave. Samotné meranie metódou CFA trvá oproti ostatným prietokovým metódam pomerne dlho, pretože prebieha až po dosiahnutí reakčnej rovnováhy. Signál CFA je na vrchole sploštený, zatiaľ čo signál u FIA býva na vrchole ostro zakončený. Koncentrácia analyzovanej látky je priamo úmerná výške píku. (19).

3.5 Segmentovaná prietoková analýza (SFA)

Segmentovaná prietoková analýza je považovaná za sofistikovanejšiu a modernejšiu modifikáciu CFA. Pri metóde SFA sa jednotlivé vzorky sekvenčne nasávajú ako široké zóny oddelené nosným roztokom a prúd kvapaliny sa väčšinou segmentuje v pravidelných intervaloch vzduchovými bublinami. Tým sa eliminuje riziko vzájomného prekrývania zón po sebe idúcich vzoriek. Po ukončení reakcie, teda v ustálenom stave, vzorka vstupuje do detekčnej cely (20) (21).

3.6 Prietoková injekčná analýza (FIA)

V polovici 70. rokov 20. storočia Růžička a Hansen predstavili novú analytickú techniku nazývanú prietoková injekčná analýza – FIA (22). Princíp metódy spočíva vo vstriedaní analytu do pohybujúceho sa prúdu nosnej kvapaliny. Vzorka je pumpovaná dvojpolohovým injekčným ventilom, pričom nosič neustále prechádza konštantnou rýchlosťou detektorom. Keď je celý objem vzorky aspirovaný, ventil sa prepne a stanovený objem vzorky je vpravený do tečúceho prúdu nosiča. Nosič prenáša analyzovanú látku cez reakčnú zónu - väčšinou reakčnú cievku- do detektoru. Vzorka reaguje s pridanými činidlami, pričom sa vytvára derivát analyzovanej látky, ktorý je ľahko detekovateľný. Prechod tejto látky detekčnou celou detektoru vytvára signál,

ktorý je spracovaný počítačom. Tento signál vytvára krivku, ktorá udáva výšku a tvar píku (23).

Najčastejšie používané detektory sú spektrometrické (spektrofotometrické, fluorometrické, chemiluminiscenčné a refraktometrické) a elektrochemické (coulometrické, ampérometrické, vodivostné a iónovo selektívne elektródy) (24).

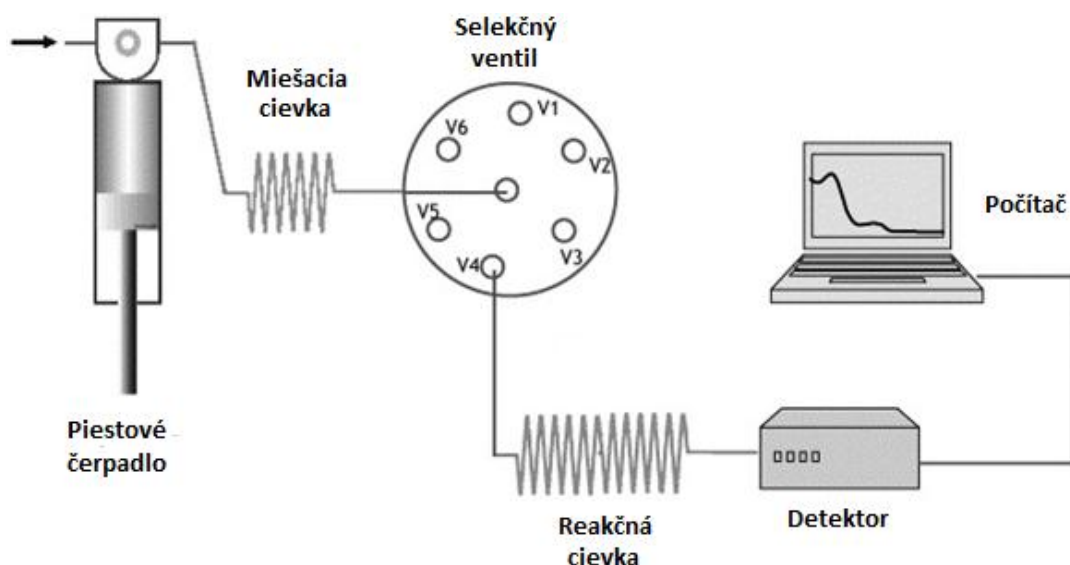
Typicky pozorujeme ostro zakončené píky zvonovitého tvaru. Pre rutinné stanovenia postačuje získať údaje o výške píku, prípadne ploche pod píkom. Pomocou týchto údajov je možné určiť koncentráciu analytu vo vzorke. U dôkladnejších stanovení sa často vyžadujú tiež podrobné informácie o šírke a tvare píku (23).

3.7 Sekvenčná injekčná analýza (SIA)

3.7.1 Charakteristika SIA

Koncepcia sekvenčnej injekčnej analýzy bola prvýkrát formulovaná v roku 1990 Růžičkom a Marshallom (25). SIA má mnoho spoločných charakteristík s FIA, preto ju možno označiť za novšiu obmenu prietokovej injekčnej analýzy. Je to viacúčelová analytická prietoková metóda, ktorá je založená na programovateľnom prúde kvapaliny. Vo svojej najjednoduchšej podobe sú roztoky vzoriek a činidiel vstrekané do prúdu nosnej kvapaliny. Počas spätného toku nosnej kvapaliny dochádza k disperzii medzi vzorkou a činidlami a na ich rozhraní vzniká reakčný produkt (26).

Kým väčšina prietokových metód využíva nepretržitý, jednosmerný prúd nosiča a činidiel, SIA je založená na používaní diskontinuálneho, obojsmerného a programovateľného toku, ktorý je presne koordinovaný a počítačom kontrolovaný (27).

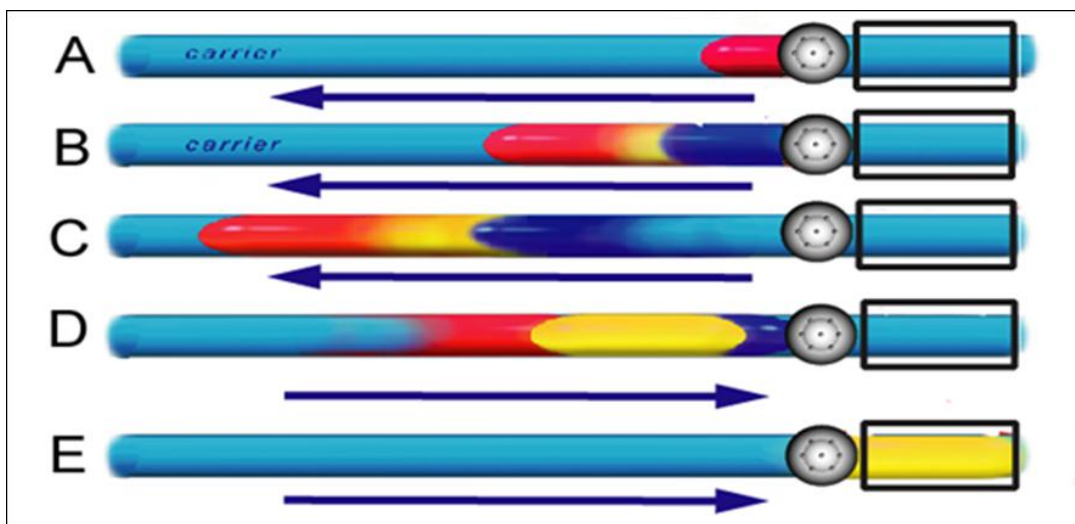


Obrázok 2 Schéma systému sekvenčnej injekčnej analýzy (27)

Klasická zostava sekvenčnej injekčnej analýzy je zobrazená na obrázku č. 1. V prvom kroku je piestovým čerpadlom aspirovaný presný objem roztoku vzorky cestou selekčného ventilu, ktorý umožňuje aspiráciu požadovaného roztoku. V ďalšom kroku sa selekčný ventil prepne do portu, ktorý je napojený na roztok činidla. Zvolený objem roztoku prvého činidla je čerpadlom aspirovaný do miešacej cievky. V treťom kroku sa selekčný ventil prepne na roztok ďalšieho činidla a určený objem je aspirovaný do miešacej cievky. Vznikajú tak tri čiastočne premiešané zóny, na rozhraní ktorých sa začína vytvárať reakčný produkt. Selekčný ventil umožňuje radenie zón vzoriek a činidiel v miešacej cievke. Štvrtý krok spočíva v prepnutí selekčného ventilu na port, ktorý je spojený s detektorom. Obrátením pohybu čerpadla sa aktivuje spätný tok nosnej kvapaliny, ktorý podnecuje dokonalé premiešanie zón a ich transport do detekčnej cely na analýzu (26) (28) (29).

Niekedy je možné uzatvoriť zónu vzorky medzi dve činidlá, čím sa zvyšuje výťažnosť chemickej reakcie (30).

Objemy aspirovaných činidiel a vzoriek sú presne určované počítačovým programom. Pomocou detekčného procesu získavame údaje o tom, aké množstvo vzorky bolo premenené na detekovateľnú formu analytu pre následné spracovávanie dát. V procese spracovávania údajov sa získava požadovaná analytická informácia. Zvyčajne je odozva detektoru zaznamenávaná ako závislosť meranej veličiny na čase (31).



Obrázok 3 Princíp vzniku a detekcie reakčného produktu (32)

Vzorka (A- červená) a činidlo (B- modrá) sú pomocou selekčného ventilu sekvenčne vstrekané do prúdu nosnej kvapaliny, ktorá je poháňaná čerpadlom. Obe zóny sú nesené prúdom nosiča, navzájom medzi sebou dispergujú a vytvárajú reakčný produkt (C- žltá). Pohyb toku je za pomoci čerpadla obrátený (D) a reakčná zmes je transportovaná do detekčnej cely, kde je reakčný produkt monitorovaný (E).

U veľmi rýchlych reakcií reakčný produkt prechádza detektorom, ktorý vytvára pík. Výška píku je priamo úmerná koncentrácii analytu. U pomalších reakcií je reakčný produkt uzatvorený v detekčnej cele, aby bolo možné sledovať nárast meraného signálu. Tu tiež dochádza k formácii rýchlostných kriviek. Uhol, ktorý zvierá krivka s vodorovnou osou je priamo úmerný koncentrácii analyzovanej látky (32).

3.7.2 Príslušenstvo SIA

Konvenčná zostava sekvenčného prietokového systému zobrazená na obrázku č. 1 je zložená z piestového čerpadla (syringe pump), miešacej cievky (holding coil), selekčného ventilu (multiposition valve), reakčnej cievky (reaction coil), detektoru a počítača (33).

Úlohou piestového čerpadla je vytvárať tok nosného prúdu. Pohyb piestu býva najčastejšie ovládaný krokovým elektromotorom a jeho rýchlosť je možné meniť podľa potreby. Základné požiadavky, ktoré musí spĺňať každé čerpadlo sú presnosť,

reprodukovateľnosť, dvojsmernosť a schopnosť merať malé objemy. Čerpadlo je ovládané a kontrolované počítačom (34) (35).

Srdcom sekvenčnej prietokovej analýzy je selekčný ventil. Úlohou selekčného ventilu je zabezpečiť priamy prístup k požadovaným roztokom, ich aspiráciu a zoradenie aspirovaných zón v miešacej cievke. Po obrátení toku sú zóny prostredníctvom selekčného ventilu transportované do detektoru (35). Väčšinou majú od šesť do dvadsaťosem portov, no v praxi sa najčastejšie používajú osemcestné alebo desaťcestné ventily. Minimálny mŕtvy objem a eliminácia rizika kontaminácie medzi jednotlivými portami patrí medzi základné požiadavky pri výbere selekčného ventilu (34).

V reakčnej cievke zóna vzorku disperguje so zónami činidiel v prúde nosnej kvapaliny a dochádza tu k vzniku reakčného produktu. Geometria reakčnej cievky je jedným z hlavných parametrov, ktoré ovplyvňujú stupeň disperzie medzi dvoma susediacimi zónami (18). Reakčná cievka je tvorená hadičkou, ktorá je zväčša zložená z polypropylénu, polyetylénu alebo teflónu (36).

Hlavným dôvodom širokého využitia sekvenčnej injekčnej analýzy je možnosť použitia akéhokoľvek detekčného systému, ktorý je schopný detekovať tok kvapaliny. Ideálne detektory majú rýchlu a stabilnú odozvu, vysokú citlivosť, lineárnu odozvu v širokom rozsahu koncentrácií analyzovanej látky, nízky mŕtvy objem, tichý pracovný režim a nie sú ovplyvnené teplotou, ani inými faktormi vonkajšieho prostredia. Hlavnou požiadavkou je prítomnosť prietokovej cely. Medzi špeciálne prietokové cely navrhnuté pre SIA systém patrí Z-cela, fountain cela alebo tzv. jet ring cela. Širokú škálu detektorov používaných u metódy FIA možno použiť aj pri stanovovaní látok metódou SIA. Konečná voľba detektoru však závisí na type uskutočnenej analytickej reakcie (37).

Kľúčovým komponentom každého systému je kvalitný počítačový program. Ten hrá dôležitú úlohu v procese riadenia automatickej analýzy vrátane zberu, spracovávania a ukladania údajov. U väčšiny programov je samozrejmosťou automatické poskytnutie údajov o výške píku, ploche pod píkom alebo šírke píku v určitej výške. Manipulácia s výsledkami merania, spájanie, vrstvenie a porovnávanie kriviek píkov generovaných u odlišných experimentálnych meraní, priamy export získaných údajov do programov ako Power Point a MS Excel, prehľadné zobrazenie

výsledkov analýzy a ďalšie užitočné funkcie sú súčasťou programov ako FIALab, Labpro alebo Flowtek (35) (38).

3.8 Sekvenčná injekčná chromatografia (SIC)

Nová generácia sekvenčnej injekčnej analýzy (SIA) nazývaná sekvenčná injekčná chromatografia je separačná metóda, v ktorej sa spájajú výhody dvoch technológií: kvapalinovej chromatografie (LC) a sekvenčnej injekčnej analýzy (SIA). Kombinuje separačné vlastnosti LC s výhodami SIA – automatizácia, programovateľnosť toku, rýchlosť analýzy, nízka spotreba činidiel, vzoriek a mobilnej fázy a nízke finančné náklady na použitú inštrumentáciu.

Technika sekvenčnej injekčnej analýzy umožňuje vykonávať separačnú analýzu a analýzu viaczložkových vzoriek bez ich predbežnej úpravy. Takéto vzorky môžeme analyzovať tiež bežnými separačnými metódami, ako napríklad kvapalinovou chromatografiou (LC), vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC), kapilárnou elektroforézou (CE) a isotachoforézou (ITP), ale tu je nutné vzorky najprv predbežne upraviť, až potom je možné ich analyzovať. Tieto metódy sú dostatočne citlivé a podávajú najspoľahlivejšie výsledky, ale vyžadujú si vysoko sofistikovaný aparát, finančne nákladné príslušenstvo a majú vysoké prevádzkové náklady (39).

Podstatou sekvenčnej injekčnej chromatografie je zapojenie monolitckej chromatografickej kolóny do klasického SIA systému, čo rieši problémy spojené s analýzou viaczložkových vzoriek. Monolitické kolóny majú oveľa väčšiu porozitu ako konvenčné kolóny používané u vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie a môžu byť zapojené do systému bez straty výkonu alebo obmedzenia v dôsledku veľmi nízkeho protitlaku kolóny. Monolitická kolóna je 2,5 alebo 5 cm dlhá a je umiestnená medzi selekčným ventilom a prietokovou celou detektoru (40).

Tak ako aj u niektorých chromatografických metód, aj SIC je založená na programovateľnom toku mobilnej fázy. Princíp metódy spočíva v aspirácii definovaného objemu vzorky, ktorá prechádza separačnou kolónou, pričom analyzovaná látka je v kolóne zadržiavaná. Následne je cestou selekčného ventilu aspirovaný určitý objem mobilnej fázy, ktorá prechodom cez separačnú kolónu zmýva separovaný analyt z povrchu stacionárnej fázy a unáša ho do detektoru. Detekcia je

vykonávaná (podobne ako pri klasických prietokových metódach) spektrometrickými alebo elektrochemickými typmi detektorov. V porovnaní so staršími prietokovými metódami SIC znižuje spotrebu činidiel i prevádzkové náklady a produkuje menšie množstvo odpadu (41) (42) (43).

3.9 Bead Injection

Technika „bead injection“ predstavuje štvrtú generáciu metód prietokovej analýzy. Metóda BI využíva mikročastice s cieľom separovať a analyzovať látky, ktoré môžu byť naviazané a uvoľnené z imobilizovaných funkčných skupín.

Veľkosť častíc, ich tvar a materiál, z ktorého sú častice vyrobené musia spĺňať prísne kritéria, aby mohli byť použité v BI systéme. Častice musia byť sférického tvaru s veľkosťou v rozsahu od 20 do 150 μm . Z materiálov sa najčastejšie používajú Sepharose a Sephadex, alebo iné chromatografické materiály so širokým výberom funkčných skupín (44).

Princíp metódy spočíva v aspirácii malého množstva suspenzie obsahujúcej mikročastice, ktoré slúžia ako nošič pevnej fázy pre činidlá alebo látky s reaktívnymi skupinami. Injektované mikročastice sú zachytené na strategickom mieste prietokového systému v bezprostrednej blízkosti prietokovej cely, alebo priamo v nej. Tu sú častice zoskupené v určitej formácii. Následne dochádza k aspirácii definovaného objemu vzorky. Zóna vzorky difunduje kolónou mikročastíc, pričom dochádza k chemickým reakciám medzi funkčnými skupinami na povrchu mikročastíc a molekulami analyzovanej látky. Látky, ktoré nereagujú s funkčnými skupinami mikročastíc sú odstránené. Stanovované látky sú následne analyzované na povrchu pevnej fázy. Na konci meracieho cyklu môžu byť mikročastice buď vyradené, regenerované, alebo premiestnené podľa potreby (45).

Zvyčajne sa používajú dve formy BI. Pri micro-beads forme sú najprv mikročastice zachytené v prietokovej cele a pri prechode vzorky zadržiavajú na svojom povrchu molekuly analytu. Pri elúcii vhodným rozpúšťadlom je roztok analytu nesený po prúde do detektoru.

On-bead detekcia využíva zachytenie analytu na povrchu mikročastíc, pričom zmena povrchu častíc po interakcii so vzorkou je stanovená priamo, transportom častíc do detektoru, alebo sú častice zachytené priamo v detekčnej cele, kde prebieha celý proces. (46).

4 . Experimentálna časť

4.1 Materiál

4.1.1 Použité chemikálie

Všetky použité chemikálie boli analytického stupňa kvality a pre prípravu všetkých roztokov bola použitá demineralizovaná destilovaná voda.

- Luminol – $\geq 98\%$, Fluka Biochemika – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
- Hydroxid sodný čistý – $>97\%$, Penta Praha, Česká republika
- Hexakynoželezitan draselný – Fluka Biochemika – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
- Peroxid vodíku 30% roztok – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
- Dusičnan kobaltnatý hexahydrát – $>98\%$, Chemapol Praha, Česká republika
- Destilovaná voda – deionizovaná systémom Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA

4.1.2 Príprava roztokov

Pre prípravu roztokov bola použitá demineralizovaná voda pripravená systémom Milli-Q na Katedre analytické chémie FAF UK v Hradci Králové. Pre prípravu všetkých roztokov boli použité sklenené odmerné banky. Vodný roztok peroxidu je nestály rýchlo sa rozkladá. Pre zabezpečenie čo najpresnejšej koncentrácie bol tento roztok pripravovaný niekoľkokrát behom merania. Všetky zásobné roztoky boli skladované v chladničke pri teplote 4 °C.

4.1.3 Príprava zásobných roztokov

Zásobný roztok $K_3[Fe(CN)_6]$ 1 mM

Zásobný roztok hexakynoželezitanu draselného 1 mM bol pripravený navážením 0,0328g hexakynoželezitanu draselného a jeho rozpustením v 100 ml destilovanej vody.

Zásobný roztok luminolu 1 mM

Zásobný roztok luminolu 1 mM v 0,1 M roztoku hydroxidu sodného bol pripravený navážením 0,4g hydroxidu sodného a jeho rozpustením v 100 ml destilovanej vody. Vznikol 0,1M roztok hydroxidu sodného. Do tohto roztoku bolo následne navážených a rozpustených 0,0177g luminolu.

Zásobný roztok $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM

Zásobný roztok dusičnanu kobaltnatého 1 mM bol pripravený navážením 0,0291g dusičnanu kobaltnatého hexahydrátu a jeho rozpustením v 100 ml destilovanej vody.

Pracovný roztok H_2O_2 1 mM

Pracovný roztok peroxidu vodíka 1 mM bol pripravený zriedením 560 μl zásobného roztoku peroxidu vodíka 30% v 50 ml destilovanej vody. 1 ml tohto roztoku bol následne zriedený v 100 ml destilovanej vody.

4.1.4 Kalibračné roztoky

Kalibračné roztoky dusičnanu kobaltnatého boli pripravované zriedením zásobného roztoku destilovanou vodou pred analýzou. Kalibračný rozsah bol v rozmedzí 1 mM – 0,001 mM.

Tab. 2 Zriedenie kalibračných roztokov

<i>objem zásobného roztoku zriedený na 10 ml</i>	<i>5</i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>0,1</i>	<i>0,05</i>	<i>0,01</i>
<i>koncentrácia $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ [mM]</i>	<i>0,5</i>	<i>0,1</i>	<i>0,05</i>	<i>0,01</i>	<i>0,005</i>	<i>0,001</i>

4.2 Použité prístroje

- Spektrofluorimeter FS 970 LC, **Schoeffel Instrument Corp.**, Westwood, USA
- piestová pumpa Cavro XL 3000, **Cavro Scientific Instruments**, San Jose, CA, USA
- osemcestný selekčný ventil, **Vici Valco Instruments**, Brockville, Ontario, Canada
- Analytické váhy A200S, **Sartorius**, Göttingen, SRN
- operačný software FAFSIA verzia 2.0 kompilovaný na LabVIEW[®] 5.1

4.3 Pracovný postup

4.3.1 Optimalizácia podmienok v systéme SIA

Cieľom optimalizácie bolo stanoviť také podmienky optimalizovaných parametrov, aby bolo stanovenie vybraných iónov čo najpresnejšie a odozva detektoru čo najvyššia v porovnaní so slepým pokusom. Aspirácia jednotlivých činidiel a vzoriek, ich premiešanie, transport výsledného produktu do detektoru a vyhodnotenie celého procesu prebiehalo automaticky prostredníctvom počítačového programu. Tým sa minimalizoval vznik možných chýb ľudského faktoru.

Pri vlastnom meraní bolo potrebné meniť na detektore citlivosť merania zmenou rozsahu stupnice detektoru, aby počítačový program mohol zobrazovať merané píky v primeranej výške. Na základe údajov o výške píku a nastavenom rozsahu stupnice bola následne vypočítaná intenzita CL podľa vzorca:

$$\frac{\text{rozsah stupnice } [\mu\text{A}] \times \text{výška píku} \times 1000}{2,5} = \text{intenzita CL } [\text{nA}]$$

Všetky parametre boli merané trikrát, výsledná hodnota bola získaná ich priemerovaním. Slepý pokus bol premeraný vždy na začiatku merania, aby nedochádzalo k interferencii medzi zvyškovými látkami a slepou vzorkou v systéme a tým aj ovplyvneniu výsledkov merania. Najvhodnejšie výsledky optimalizačného procesu boli použité pre kalibračné meranie.

4.3.2 Optimalizácia sekvencie aspirovaných zón

Vhodná sekvencia aspirovaných zón použitá pre stanovenie kobaltnatých iónov bola zistená premeraním všetkých kombinácií poradia aspirovaných zón. Testovaný bol vplyv poradia aspirácie pridávaných látok na intenzitu CL. Cieľom optimalizácie bolo dosiahnuť čo najvyššiu odozvu detektoru.

4.3.2.1 Optimalizácia sekvencie pre železité ióny

Pri tejto optimalizácii boli použité roztoky $K_3[Fe(CN)_6]$ o koncentrácii $c = 1$ mM, roztok luminolu ($c = 1$ mM) a pracovný roztok peroxidu vodíka ($c = 1$ mM). Cieľom merania bolo zistiť vplyv poradia aspirovaných zón na intenzitu CL a porovnať tieto hodnoty s hodnotami intenzity získanými pri experimente, ktorý bol vykonaný s kobaltnatými iónmi. Porovnanie týchto hodnôt umožní zistiť, ktorý z týchto iónov má vyššiu katalytickú účinnosť na použitú CL reakciu.

Meranie prebiehalo pri napätí 200V. Aspiračný objem všetkých použitých roztokov bol 50 μ l a prietoková rýchlosť činila 100 μ l/s. Premeraných bolo všetkých šesť možných kombinácií sekvencie.

1. $K_3[Fe(CN)_6]$ – luminol – H_2O_2
2. luminol – $K_3[Fe(CN)_6]$ – H_2O_2
3. H_2O_2 – $K_3[Fe(CN)_6]$ – luminol
4. $K_3[Fe(CN)_6]$ – H_2O_2 – luminol
5. luminol – H_2O_2 – $K_3[Fe(CN)_6]$
6. H_2O_2 – luminol – $K_3[Fe(CN)_6]$

4.3.2.2 Optimalizácia sekvencie s použitím kobaltnatých a železitých iónov

Pri tejto optimalizácii boli použité roztoky $Co(NO_3)_2$, $K_3[Fe(CN)_6]$, luminolu a peroxidu vodíka. Experiment za prítomnosti iónov hexakynoželezitanu a kobaltnatých iónov bol vykonávaný za účelom zistenia, či sa tieto ióny nejako zásadne

ovplyvňujú pri katalýze CL reakcie, prípadne či nie je efekt týchto iónov vyšší pri ich kombinácii. Kvôli možnej vzájomnej interferencii boli roztoky kobaltnatých a železitých iónov aspirované čo najďalej od seba.

Koncentrácia všetkých meraných roztokov pri meraní bola 1 mM. Meranie prebiehalo pri napätí 200V, aspiračný objem všetkých roztokov činil 50 μ l a prietoková rýchlosť bola 100 μ l/s.

Premierané boli nasledujúce štyri sekvencie:

1. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{luminol} - \text{Co}(\text{NO}_3)_2$
2. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] - \text{luminol} - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{Co}(\text{NO}_3)_2$
3. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 - \text{luminol} - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
4. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{luminol} - \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

4.3.2.3 Optimalizácia sekvencie pre kobaltnaté ióny

Pri tejto optimalizácii boli použité roztoky kobaltnatých iónov, roztok luminolu a peroxidu vodíka. Koncentrácia všetkých meraných roztokov pri meraní bola 1 mM. Meranie prebiehalo pri napätí 200V, aspiračný objem všetkých roztokov činil 50 μ l a prietoková rýchlosť bola 100 μ l/s.

Premieraných bolo šesť sekvencií:

1. $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{luminol} - \text{Co}(\text{NO}_3)_2$
2. $\text{luminol} - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{Co}(\text{NO}_3)_2$
3. $\text{luminol} - \text{Co}(\text{NO}_3)_2 - \text{H}_2\text{O}_2$
4. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 - \text{luminol} - \text{H}_2\text{O}_2$
5. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{luminol}$
6. $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Co}(\text{NO}_3)_2 - \text{luminol}$

4.3.3 Optimalizácia prietokovej rýchlosti detektorom

Pri optimalizácii prietokovej rýchlosti bol meraný vplyv zmeny rýchlosti konečného produktu reakcie prechádzajúceho cez detektor na intenzitu CL. Cieľom tejto optimalizácie bolo zistiť prietokovú rýchlosť, pri ktorej by bola odozva detektoru najvyššia.

4.3.3.1 Optimalizácia prietokovej rýchlosti so železitými iónmi

Pri tejto optimalizácii boli použité roztoky železitých iónov, luminolu a peroxidu vodíka. Prietoková rýchlosť bola meraná v rozmedzí 80 $\mu\text{l/s}$ – 120 $\mu\text{l/s}$. Koncentrácia všetkých meraných roztokov bola 1 mM. Meranie prebiehalo pri napätí 200V, aspiračný objem všetkých použitých roztokov činil 50 μl .

Použitá bola sekvencia, ktorá vykazovala v predošlom meraní najvyššie hodnoty CL:

1. H_2O_2
2. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
3. Luminol

4.3.3.2 Optimalizácia prietokovej rýchlosti s kobaltnatými iónmi

Pri optimalizácii boli použité roztoky kobaltnatých iónov, luminolu a peroxidu vodíka. Prietoková rýchlosť bola meraná v rozmedzí 40 $\mu\text{l/s}$ – 140 $\mu\text{l/s}$. Použitá koncentrácia Co bola 0,01 mM. Ostatné roztoky použité pri meraní mali koncentráciu 1 mM. Meranie prebiehalo pri napätí 200V, aspiračný objem všetkých roztokov činil 50 μl .

Použitá sekvencia: 1. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

2. Luminol
3. H_2O_2

4.3.4 Optimalizácia koncentrácie činidiel

4.3.4.1 Optimalizácia koncentrácie peroxidu vodíka

Pri optimalizácii koncentrácie činidiel bola menená koncentrácia H_2O_2 v rozpätí 5 mM – 0,05 mM, pričom bola zachovaná konštantná koncentrácia kobaltnatých iónov na úrovni $c = 0,01$ mM a luminolu na úrovni $c = 1$ mM. Každý nameraný výsledok bol porovnávaný s hodnotami slepého pokusu. Pri optimalizácii bol pre všetky roztoky použitý objem $V = 50$ μl , použité napätie bolo 200V a prietoková rýchlosť 110 $\mu\text{l/s}$. Cieľom merania bolo dosiahnuť čo najvyššiu intenzitu CL vzorku a zároveň čo najvyšší rozdiel intenzít medzi $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ a slepým pokusom.

Použitá sekvencia: 1. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

2. Luminol

3. H_2O_2

4.3.4.2 Optimalizácia koncentrácie luminolu

Pri optimalizácii koncentrácie činidiel bola menená koncentrácia luminolu v rozpätí 5 mM – 0,05 mM, pričom bola zachovaná konštantná koncentrácia kobaltnatých iónov na úrovni $c = 0,01$ mM a peroxidu na úrovni $c = 5$ mM. Peroxid vodíka bol použitý v koncentrácii 5 mM, pretože pri tejto koncentrácii bola vykazovalná najvyššia odozva detektoru.

Každý nameraný výsledok bol porovnávaný s hodnotami slepého pokusu. Pri optimalizácii bol pre všetky roztoky použitý objem $V = 50$ μl , napätie bolo 200V a prietoková rýchlosť 110 $\mu\text{l/s}$.

Použitá sekvencia: 1. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

2. Luminol

3. H_2O_2

4.3.5 Optimalizácia objemu činidiel a prietokovej rýchlosti

Pri optimalizácii objemu činidla bol zachovaný konštantný objem roztoku kobaltnatých iónov $V = 50 \mu\text{l}$. Objem luminolu a H_2O_2 bol menený v rozsahu $5 \mu\text{l} - 100 \mu\text{l}$ a prietoková rýchlosť detektoru bola testovaná v rozmedzí $40 \mu\text{l/s} - 150 \mu\text{l/s}$. Všetky tri parametre boli optimalizované naraz metódou modifikovaného Simplexu a pre každé meranie boli nastavované automaticky pomocou počítačového programu.

Boli vykonané tri série meraní o takom počte meraní v sérii, aké určil počítačový program. Pre optimalizáciu bol použitý roztok $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ o koncentrácii $c = 0,01 \text{ mM}$ a roztoky činidiel o koncentrácii $c = 5 \text{ mM}$. Účelom bolo nájsť takú prietokovú rýchlosť a objemy činidiel, pri ktorých je intenzita CL najvyššia.

Použitá sekvencia: 1. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

2. Luminol

3. H_2O_2

4.3.6 Kalibračná závislosť

V predošlej optimalizácii boli zaznamenané najvyššie hodnoty intenzity CL u dvoch meraní. Tieto dve merania boli najprv samostatne premerané a porovnané so slepým pokusom, aby bolo možné na základe rozdielu určiť vhodné parametre pre kalibračné meranie.

Kalibračné roztoky boli pripravené zo zásobných roztokov, pracovný roztok H_2O_2 bol pripravený tesne pred použitím. Bola zistená intenzita CL roztokov v odstupňovanej koncentrácii v rozmedzí $1 \text{ mM} - 0,001 \text{ mM Co}(\text{NO}_3)_2$.

Pri meraniach kalibračnej závislosti bol u luminolu použitý objem $V = 85 \mu\text{l}$ o koncentrácii 5 mM a u H_2O_2 objem $V = 53 \mu\text{l}$ roztoku o koncentrácii 5 mM . Prietoková rýchlosť detektorom bola $127 \mu\text{l/s}$. Každý roztok bol premeraný trikrát, výsledná hodnota intenzity CL bola stanovená ako rozdiel priemeru všetkých troch nameraných hodnôt a slepého pokusu.

Pri zisťovaní kalibračnej závislosti bola použitá sekvencia:

1. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

2. Luminol

3. H_2O_2

4.3.7 Opakovateľnosť

Opakovateľnosť je tesnosť zhody medzi výsledkami merania tej istej meranej veličiny rovnakého objektu alebo javu pri zachovaní zhodného súboru podmienok. Rovnakým súborom podmienok sa rozumie použitie rovnakej metódy, tým istým pracovníkom, na tom istom prístroji, na rovnakom mieste, pri rovnakých pracovných podmienkach a opakovane po krátkom časovom úseku (1).

Bolo uskutočnených desať meraní v troch sériách v krátkom časovom úseku za sebou, aby boli zachované rovnaké podmienky merania. Pre merania bola vybraná koncentrácia kobaľnatých iónov $c = 0,01 \text{ mM}$, $c = 0,1 \text{ mM}$ a slepý pokus. Cieľom bolo zistiť hodnoty intenzity CL a RSD (%) meraných roztokov. Všetky ostatné parametre merania boli zhodné s parametrami kalibračného merania.

5 . Výsledky

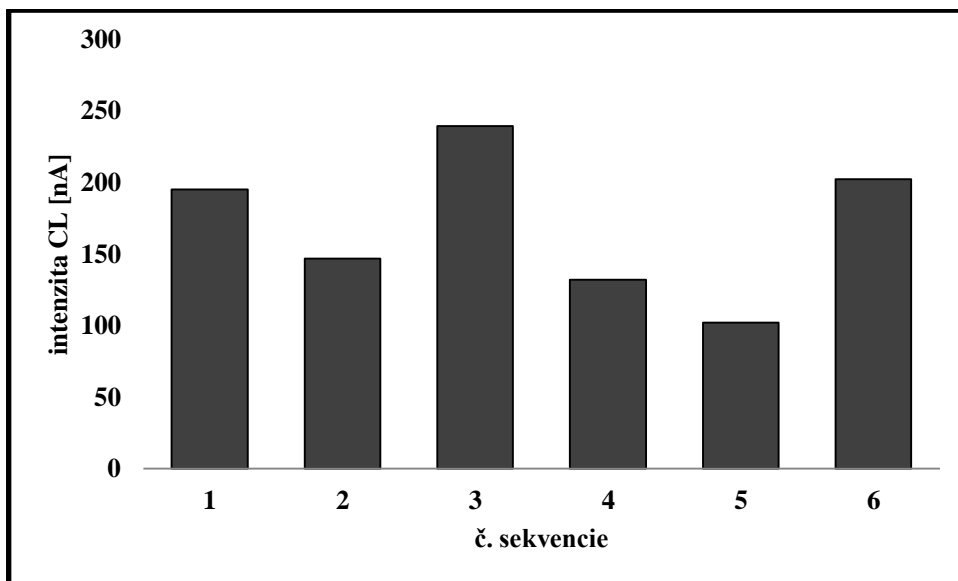
5.1 Optimalizácia sekvencie aspirovaných zón

5.1.1 Optimalizácia sekvencie pre železité ióny

Meranie bolo vykonané za účelom porovnania vplyvu železitých iónov s vplyvom kobaltnatých iónov pri katalýze CL reakcie. Pri porovnaní tabuliek 3 a 5 je zreteľne vidieť, že intenzita CL pri katalýze železitými iónmi je výrazne vyššia ako intenzita CL nameraná pri použití kobaltnatých iónov. Najvyššie hodnoty píkuv a teda aj najvyššia intenzita CL boli zaznamenané pri treťom meraní, teda v poradí peroxid vodíka, Fe a luminol. Ako je vidieť na grafe č. 1, sila odozvy detektoru nepravidelne klesá a rastie v závislosti na použitej sekvencii. Celkové hodnoty intenzít všetkých šiestich meraných sekvencií a chyby jednotlivých meraní sú zahrnuté v tabuľke č. 3.

Tab. 3 Optimalizácia sekvencie pre $K_3[Fe(CN)_6]$

č. merania	výška píku	\emptyset	intenzita CL [nA]	\emptyset intenzity [nA]	RSD [%]
1.	0,989 0,988 0,952	0,976	197,8 197,6 190,4	195,2	1,76
2.	0,740 0,736 0,722	0,733	148 147,2 144,4	146,6	1,05
3.	1,187 1,174 1,226	1,196	237,5 234,8 245,2	239,2	1,84
4.	0,662 0,668 0,65	0,660	132,4 133,6 130,0	132,0	1,13
5.	0,508 0,508 0,517	0,511	101,6 101,6 103,4	102,2	0,83
6.	1,003 1,015 1,015	1,011	200,6 203,0 203,0	202,2	0,56



Graf č. 1 *Optimalizácia sekvencie s Fe*

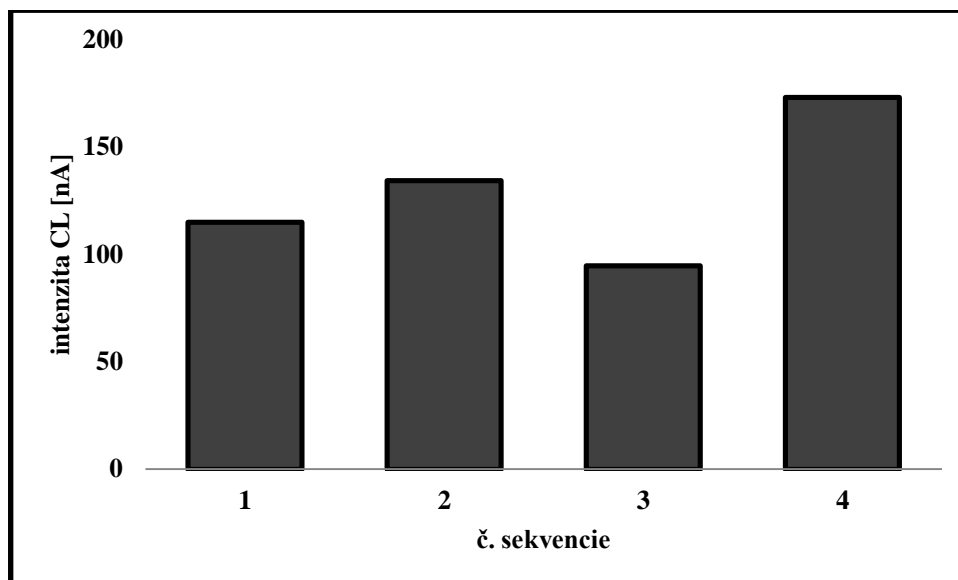
5.1.1.1 Optimalizácia sekvencie pre kobaltnaté a železité ióny

Experiment bol prevedený s cieľom zistiť vplyv železitých iónov v kombinácii s kobaltnatými iónmi pri katalýze CL luminolu. Aby nedochádza k interferencii medzi iónmi hexakynoželezitanu a kobaltnatými iónmi, boli tieto zóny aspirované čo najďalej od seba. Z tohto dôvodu boli premerané len štyri sekvencie, ktorých výsledky sú znázornené v tabuľke č. 2. Na grafe č. 2 je vidieť, že z hľadiska intenzity CL je najvýhodnejšie najprv aspirovať roztok obsahujúci kobaltnaté ióny, za nimi roztok peroxidu a luminolu a nakoniec roztok obsahujúci železité ióny.

Tab. 4 *Optimalizácia sekvencie s Co a $K_3[Fe(CN)_6]$*

č. merania	výška píku	Ø	intenzita CL [nA]	Ø intenzity [nA]	RSD [%]
1.	0,568 0,573 0,584	0,575	113,6 114,6 116,8	115,0	1,16
2.	0,672 0,679 0,665	0,672	134,4 135,8 133,0	134,4	0,85
3.	0,466 0,477 0,480	0,474	93,2 95,4 96,0	94,8	1,27

4.	0,878 0,853 0,867	0,866	175,6 170,6 173,4	173,2	1,18
----	-------------------------	--------------	-------------------------	--------------	-------------



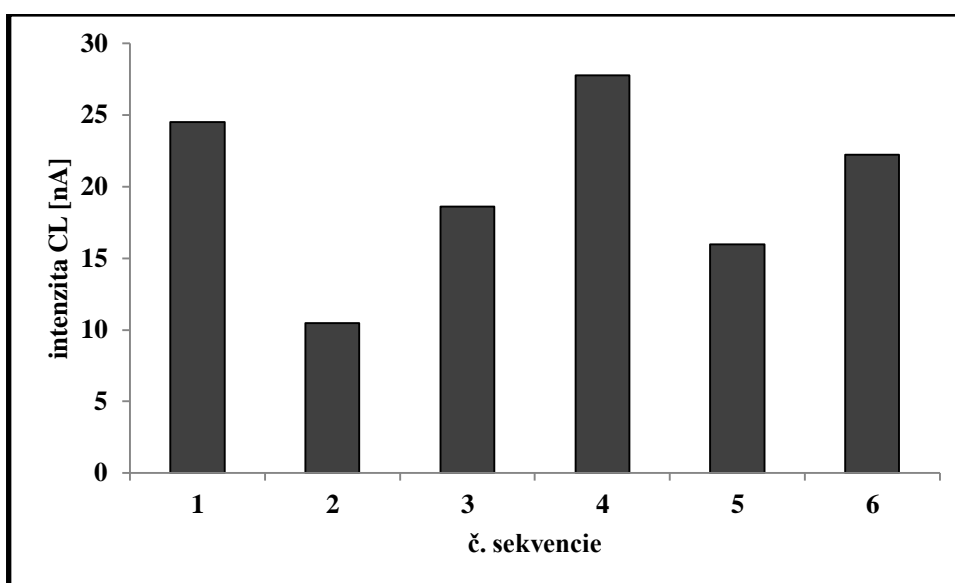
Graf č. 2 *Optimalizácia sekvencie s Co a Fe*

5.1.2 Optimalizácia sekvencie pre kobaltnaté ióny

Pri tejto optimalizácii boli aspirované roztoky kobaltnatých iónov, peroxidu vodíka a luminolu. Vykonaných bolo šesť meraní, boli teda premerané všetky kombinácie aspirovaných roztokov. Hodnoty intenzity všetkých vzoriek sa odobraním hexakyanoželezitanu znížili. Ako ukazuje tabuľka č. 5, najvýhodnejšie je aspirovať najprv roztok kobaltnatých iónov, za nimi roztok luminolu a nakoniec roztok peroxidu vodíka.

Tab. 5 Optimalizácia sekvencie s Co

č. merania	výška píku	Ø	intenzita CL [nA]	Ø intenzity [nA]	RSD [%]
1.	0,396 0,406 0,397	0,399	15,84 16,24 15,88	15,99	1,12
2.	0,269 0,249 0,267	0,262	10,76 9,96 10,68	10,47	3,44
3.	0,469 0,452 0,479	0,467	18,76 18,08 19,06	18,63	2,2
4.	0,701 0,695 0,686	0,694	28,06 27,80 27,44	27,77	0,92
5.	0,610 0,622 0,608	0,613	24,40 24,88 24,32	24,53	1,10
6.	0,567 0,559 0,541	0,557	22,68 22,36 21,64	22,22	1,96



Graf č. 3 Optimalizácia sekvencie s Co

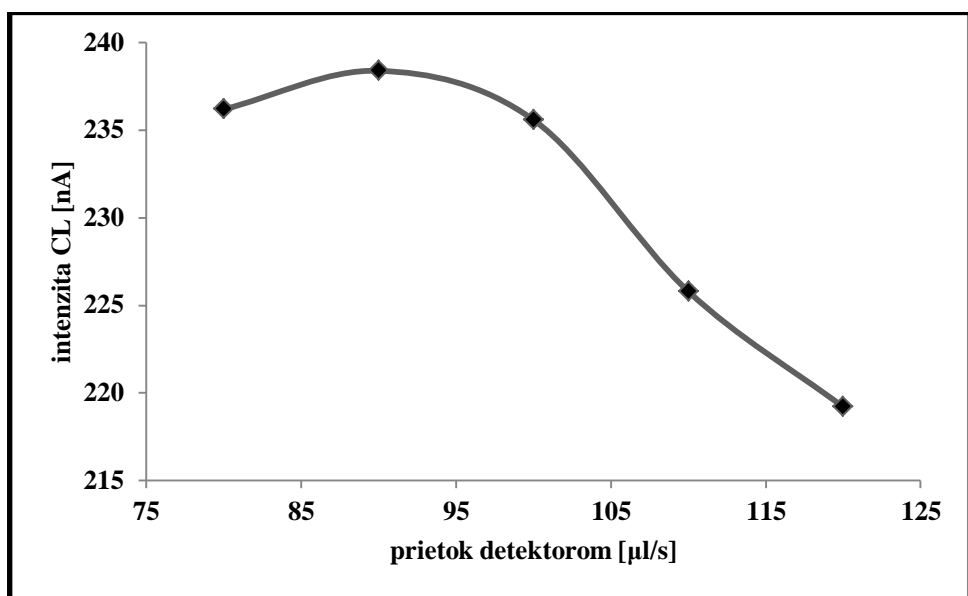
5.2 Optimalizácia prietokovej rýchlosti detektorom

5.2.1 Optimalizácia prietokovej rýchlosti so železitými iónmi

Optimálna prietoková rýchlosť detektorom bola zisťovaná v rozmedzí 80 $\mu\text{l/s}$ – 120 $\mu\text{l/s}$. Ako ukazuje tabuľka č. 5, optimálna rýchlosť prietoku detektorom bola 90 $\mu\text{l/s}$, keďže pri tejto rýchlosti bola zaznamenaná najvyššia intenzita CL. Po dosiahnutí optimálnej rýchlosti dochádza k tomu, že so zvyšujúcou sa prietokovou rýchlosťou postupne klesá intenzita CL (Graf č. 8).

Tab. 6 Optimalizácia prietokovej rýchlosti pre Fe

č. merania	prietoková rýchlosť [$\mu\text{l/s}$]	\emptyset výšky píku	intenzita CL [nA]	\emptyset intenzity [nA]	RSD [%]
1.	80	1,181	242,6 234,6 231,6	236,2	1,97
2.	90	1,192	243,2 238,6 233,0	238,4	1,75
3.	100	1,178	236,4 238,8 231,2	235,6	1,35
4.	110	1,129	228,6 221,8 227,4	225,8	1,31
5.	120	1,096	224,2 220,6 212,6	219,2	2,21



Graf č. 4 Optimalizácia prietokovej rýchlosti s Fe

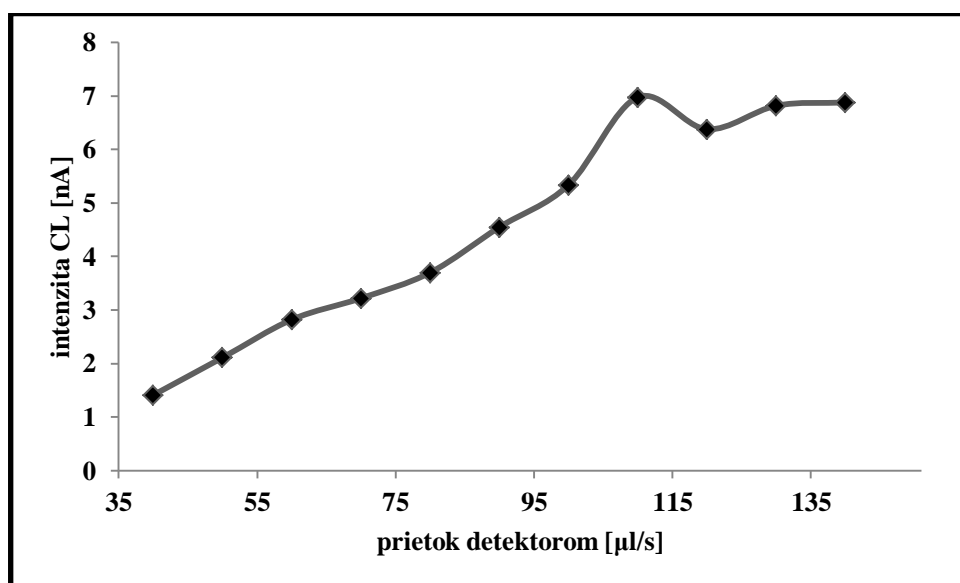
5.2.2 Optimalizácia prietokovej rýchlosti s kobaltnatými iónmi

Pri porovnaní intenzít CL z tabuľky 6 a 7 je jasne vidieť, že odozva detektoru, resp. intenzita CL sa rapídne znížila odobraním $K_3[Fe(CN)_6]$ z reakcie. Z tabuľky 6 je zrejmé, že najvyššia odozva detektoru bola zaznamenaná pri rýchlosti 110 $\mu\text{l/s}$, kedy sa až po optimálnu prietokovú rýchlosť intenzita CL zvyšovala a po jej dosiahnutí došlo u vyšších prietokových rýchlostí k miernemu poklesu intenzity (Graf č. 9).

Tab. 7 Optimalizácia prietokovej rýchlosti pre Co

č. merania	prietoková rýchlosť [$\mu\text{l/s}$]	Ø výšky píku	intenzita CL [nA]	Ø intenzity [nA]	RSD [%]
1.	40	0,355	1,432 1,380 1,440	1,41	1,89
2.	50	0,526	2,040 2,232 2,044	2,11	4,25
3.	60	0,704	2,700 2,890 2,860	2,82	2,96

4.	70	0,806	3,080 3,328 3,264	3,22	3,26
5.	80	0,925	3,464 3,780 3,856	3,70	4,59
6.	90	1,141	4,450 4,496 4,720	4,55	2,59
7.	100	1,335	4,988 5,456 5,584	5,34	4,80
8.	110	1,745	6,980 7,004 6,964	6,98	0,24
9.	120	1,595	6,368 6,448 6,328	6,38	0,78
10.	130	1,701	6,800 7,008 6,632	6,82	2,25
11.	140	1,722	6,720 7,016 6,922	6,88	1,79



Graf č. 5 Optimalizácia prietokovej rýchlosti pre Co

5.3 Optimalizácia koncentrácie činidiel

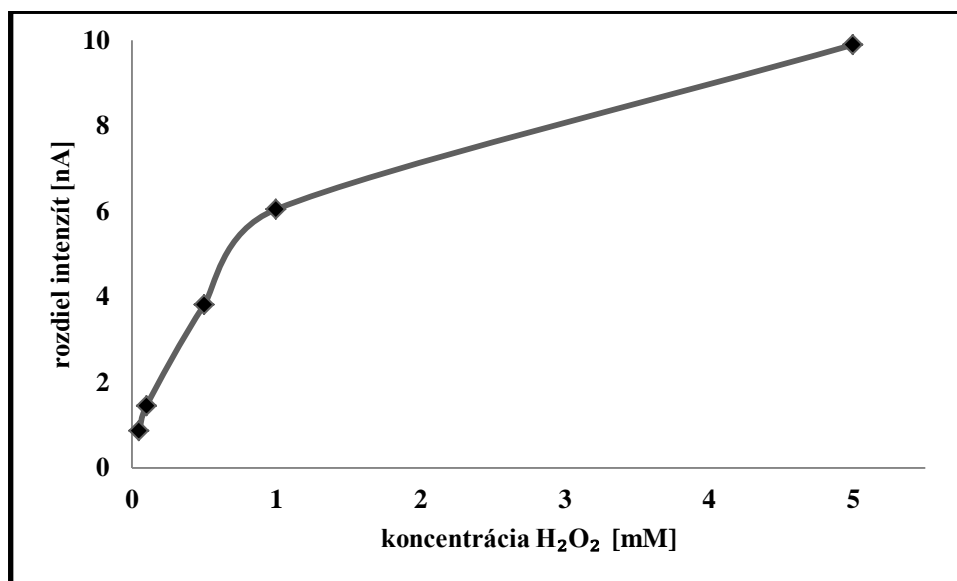
5.3.1 Optimalizácia koncentrácie peroxid vodíka

Boli premerané vzorky s koncentráciou peroxidu vodíka v rozmedzí 5 mM – 0,05 mM. Nameraná intenzita CL bola porovnávaná s intenzitou slepého pokusu. Cieľom merania bolo zistiť vhodnú koncentráciu peroxidu pre meranie kalibračnej závislosti. V tabuľke 7 je zobrazený rozdiel intenzít medzi slepým pokusom a meranou vzorkou. Najväčší rozdiel v porovnaní so slepým pokusom vykazovala vzorka s koncentráciou 5 mM peroxidu, 1 mM luminolu a 0,01 mM kobaľnatých iónov.

Tab. 8 Optimalizácia koncentrácie peroxidu vodíka

c H ₂ O ₂ [mM]	výška píku	Ø	intenzita CL [nA]	Ø intenzity [nA]	RSD [%]	rozdiel intenzít [nA]
5	0,876 0,881 0,883	0,880	17,52 17,60 17,66	17,59	0,33	9,90
slepý p.	0,371 0,380 0,402	0,384	7,42 7,60 8,04	7,69	3,39	
1	0,983 0,978 0,974	0,978	19,66 19,56 19,48	19,56	0,38	6,05
slepý p.	1,682 1,686 1,697	1,690	13,45 13,49 13,57	13,51	0,37	
0,5	2,038 1,992 2,124	2,052	16,3 15,94 16,99	16,41	2,65	3,81
slepý p.	1,582 1,589 1,578	1,583	12,65 12,71 12,62	12,61	0,30	
0,1	0,484 0,473 0,481	0,479	3,85 3,78 3,87	3,84	1,00	1,45
slepý p.	0,290 0,308 0,297	0,298	2,32 2,46 2,38	2,39	2,40	

0,05	0,519 0,511 0,538	0,523	2,08 2,04 2,15	2,09	2,18	0,86
slepý p.	0,314 0,311 0,297	0,307	1,26 1,24 1,19	1,23	2,39	



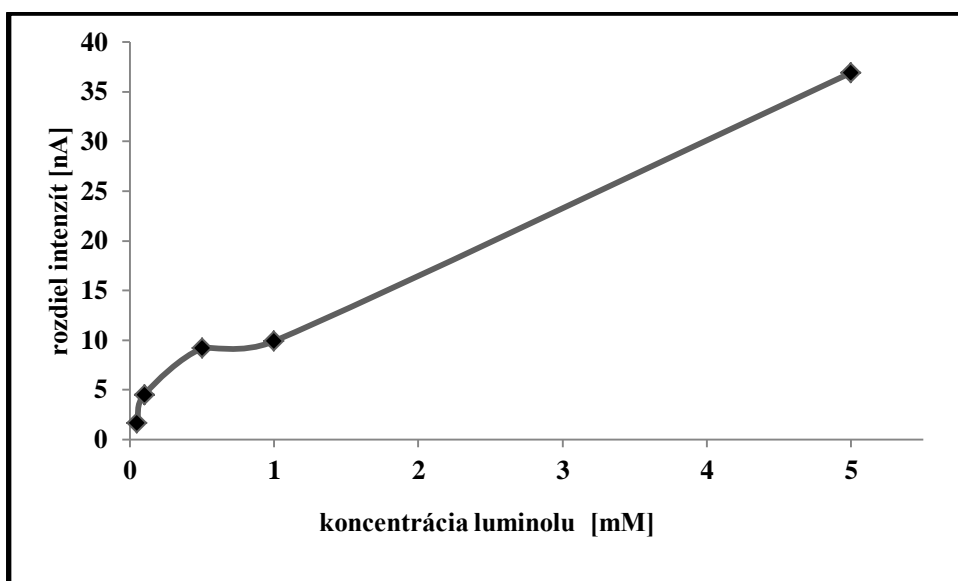
Graf č. 6 Optimalizácia koncentrácie peroxidu

5.3.2 Optimalizácia koncentrácie luminolu

Boli premerané vzorky s koncentráciou luminolu v rozmedzí 5 mM – 0,05 mM. Nameraná intenzita CL jednotlivých vzoriek bola porovnávaná s intenzitou slepého pokusu. Cieľom merania bolo zistiť vhodnú koncentráciu luminolu, ktorá by mohla byť použitá pre meranie kalibračnej závislosti. Tabuľka 8 zobrazuje hodnoty intenzít CL pre vzorky aj slepé pokusy, tak ako aj rozdiely intenzít medzi slepým pokusom a meranou vzorkou. Najväčší rozdiel intenzít vykazovala vzorka s koncentráciou 5 mM luminolu, 5 mM peroxidu a 0,01 mM kobaltných iónov. Vzorka s takýmto zložením bola preto použitá pri zisťovaní kalibračnej závislosti.

Tab. 9 Optimalizácia koncentrácie luminolu

c luminolu [mM]	výška píku	Ø	intenzita CL [nA]	Ø intenzity [nA]	RSD [%]	rozdiel intenzít [nA]
5	1,074 1,058 1,021	1,059	85,92 84,64 81,68	84,08	2,11	36,92
slepý p.	0,603 0,587 0,578	0,589	48,24 46,96 46,24	47,16	1,75	
1	0,876 0,881 0,883	0,880	17,52 17,60 17,66	17,59	0,33	9,90
slepý p.	0,371 0,380 0,402	0,384	7,42 7,60 8,04	7,69	3,39	
0,5	0,765 0,768 0,766	0,766	15,30 15,36 15,32	15,32	0,16	9,18
slepý p.	0,311 0,296 0,311	0,307	6,20 5,92 6,20	6,14	2,15	
0,1	0,478 0,471 0,481	0,476	9,56 9,42 9,62	9,53	0,88	4,52
slepý p.	0,249 0,246 0,257	0,250	4,98 4,92 5,14	5,01	1,85	
0,05	0,366 0,353 0,349	0,356	7,32 7,06 6,98	7,12	2,04	1,67
slepý p.	0,269 0,270 0,278	0,273	5,38 5,40 5,56	5,45	1,48	



Graf č. 7 Optimalizácia koncentrácie luminolu

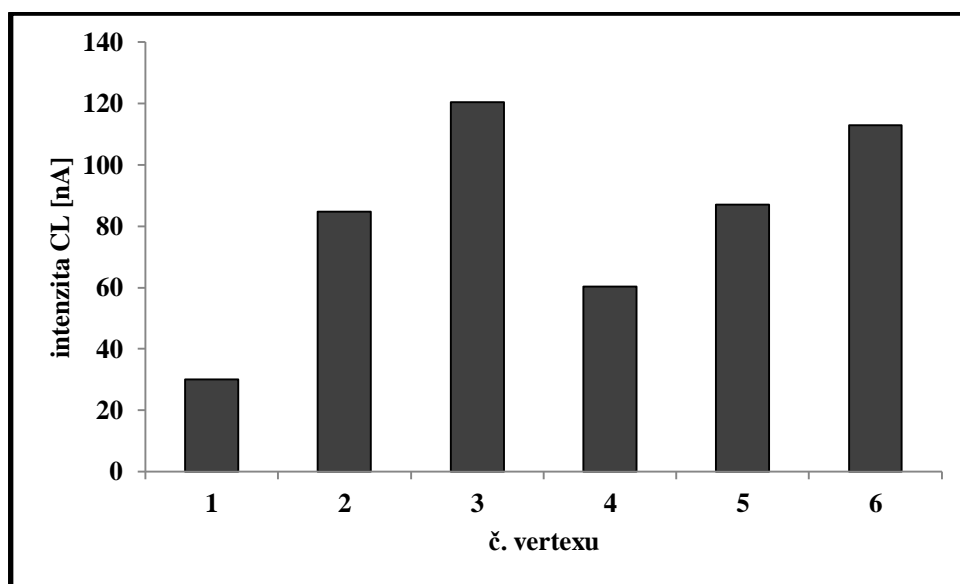
5.4 Optimalizácia objemu činidiel a prietokovej rýchlosti

5.4.1 Optimalizácia č. 1

V tejto optimalizácii bolo vykonaných šesť meraní, pri ktorých počítačový program automaticky menil objem luminolu v rozmedzí 10 μl – 82 μl , objem peroxidu v rozmedzí 5 μl – 70 μl a prietokovú rýchlosť od 40 $\mu\text{l/s}$ do 147 $\mu\text{l/s}$. Na grafe č. 8 možno vidieť, že najvyššia intenzita CL bola dosiahnutá pri treťom meraní, teda pri aspirácii 35 μl luminolu, 55 μl peroxidu a prietokovej rýchlosti 110 $\mu\text{l/s}$. Pri tomto meraní bola taktiež dosiahnutá najnižšia chyba merania $\text{RSD} = 3,57\%$.

Tab. 10 Optimalizácia objemu a prietokovej rýchlosti č. 1

č. vertexu	V luminolu [μl]	V H_2O_2 [μl]	prietoková rýchlosť [$\mu\text{l/s}$]	\emptyset	\emptyset intenzity [nA]	RSD [%]
1.	10	70	40	0,376	30,10	16,94
2.	60	15	80	1,060	84,80	8,74
3.	35	55	110	1,505	120,40	3,57
4.	25	35	60	0,755	60,40	6,04
5.	66	5	120	1,089	87,12	8,92
6.	82	15	147	1,411	112,88	4,58



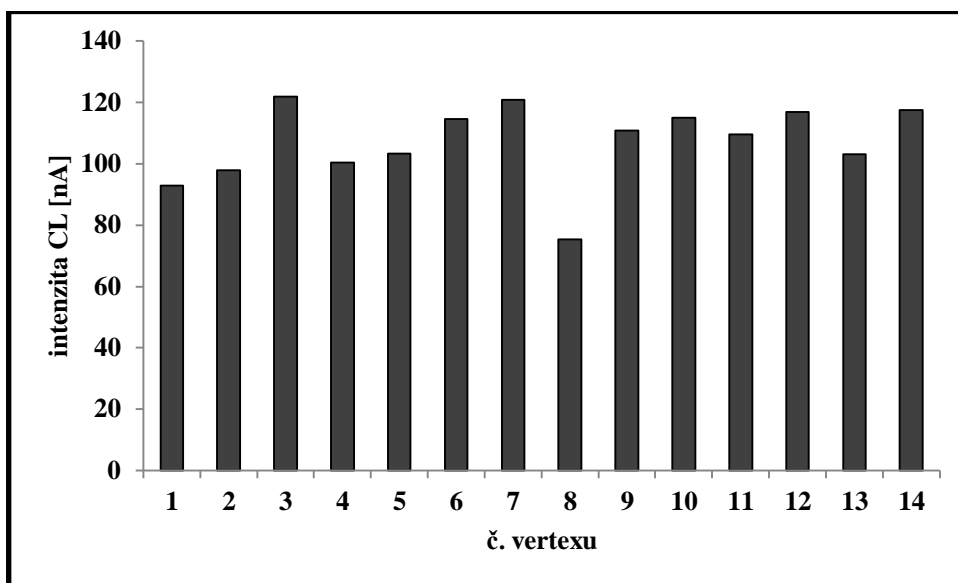
Graf č. 8 *Optimalizácia objemu a prietokovej rýchlosti č. 1*

5.4.2 Optimalizácia č. 2

Bolo vykonaných štrnásť meraní, pri ktorých bol menený objem luminolu v rozsahu 10 μl – 70 μl , objem peroxidu v rozsahu 17 μl – 76 μl a prietokovú rýchlosť od 80 $\mu\text{l/s}$ do 150 $\mu\text{l/s}$. Graf č. 8 ukazuje, že najvyššia intenzita bola dosiahnutá pri treťom meraní, teda pri rovnakých parametroch ako prvá optimalizácia.

Tab. 11 *Optimalizácia objemu a prietokovej rýchlosti č. 2*

č. vertexu	V luminolu [μl]	V H_2O_2 [μl]	prietoková rýchlosť [$\mu\text{l/s}$]	\emptyset	\emptyset intenzity [nA]	RSD [%]
1.	25	60	90	1,161	92,88	2,62
2.	70	25	80	1,223	97,84	8,64
3.	35	55	110	1,525	122,00	4,34
4.	25	35	130	1,256	100,48	2,82
5.	62	17	123	1,292	103,36	7,09
6.	20	43	150	1,432	114,56	1,89
7.	53	42	125	1,510	120,80	3,13
8.	10	76	134	0,942	75,36	9,38
9.	49	32	126	1,386	110,88	4,73
10.	23	61	131	1,438	115,04	1,90
11.	54	62	94	1,369	109,52	0,89
12.	28	48	136	1,460	116,80	1,21
13.	54	36	116	1,288	103,04	5,46
14.	31	55	127	1,469	117,52	1,41



Graf č. 9 Optimalizácia objemu a prietokovej rýchlosti č. 2

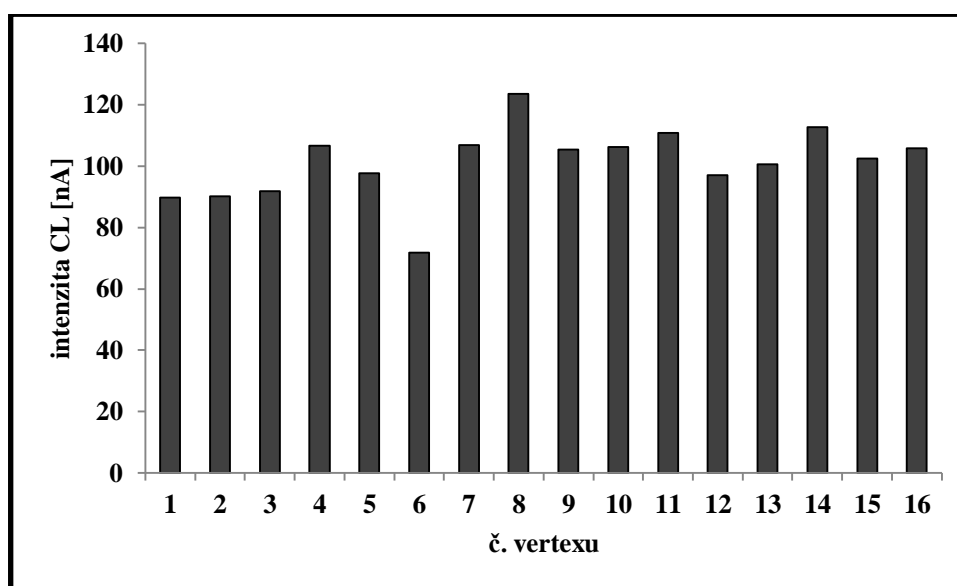
5.4.3 Optimalizácia č. 3

U tretej optimalizácie bolo vykonaných šesťnásť meraní. Objem luminolu bol menený v rozsahu 25 μl – 100 μl , objem peroxidu v rozmedzí 5 μl – 75 μl a prietoková rýchlosť sa menila od 90 $\mu\text{l/s}$ do 137 $\mu\text{l/s}$. Na tabuľke 10 je vidieť, že najvyššie hodnoty intenzity boli dosiahnuté pri ôsmom meraní. Podľa výsledkov tejto optimalizácie je najvýhodnejšie aspirovať 85 μl luminolu a 53 μl peroxidu vodíka pri prietokovej rýchlosti 127 $\mu\text{l/s}$.

Tab. 12 Optimalizácia objemu a prietokovej rýchlosti č. 3

č. vertexu	V luminolu [μl]	V H_2O_2 [μl]	prietoková rýchlosť [$\mu\text{l/s}$]	\emptyset	\emptyset intenzity [nA]	RSD [%]
1.	25	60	100	1,122	89,76	6,99
2.	40	75	90	1,127	90,16	6,56
3.	55	25	110	1,147	91,76	2,39
4.	70	35	130	1,334	106,72	1,12
5.	85	30	120	1,222	97,76	1,35
6.	87	5	137	0,899	71,92	0,78
7.	55	52	105	1,335	106,80	6,51
8.	85	53	127	1,545	123,60	4,86

9.	100	67	135	1,317	105,36	2,23
10.	55	63	122	1,329	106,32	7,67
11.	62	55	122	1,386	110,88	3,04
12.	65	72	105	1,213	97,04	1,22
13.	69	44	124	1,259	100,72	4,25
14.	74	54	124	1,410	112,80	1,76
15.	70	52	116	1,281	102,48	1,87
16.	78	44	128	1,322	105,76	2,68
17.	88	49	137	1,520	121,70	4,61
18.	87	60	131	1,387	110,96	2,94



Graf č. 10 *Optimalizácia objemu a prietokovej rýchlosti č. 3*

Celková hodnota intenzity CL je zo všetkých troch optimalizácií najvyššia práve u merania s parametrami 85, 55, 127. V predošlých dvoch optimalizáciách však boli dosiahnuté najlepšie výsledky pri použití parametrov 35, 55, 110. Preto bude vhodné porovnať oba tieto merania so slepím pokusom, aby bolo možné jednoznačne určiť, aké objemy činidiel a prietokovú rýchlosť bude najvýhodnejšie použiť pre meranie kalibračnej závislosti.

(85, 53, 127)

Pri tomto meraní porovnávam intenzitu CL vzorky so zložením 50 μ l roztoku kobaltnatých iónov, 85 μ l luminolu, 53 μ l peroxidu vodíka so slepím pokusom pri

prietokovej rýchlosti 127 $\mu\text{l/s}$. Ako je zobrazené v tabuľke 11, rozdiel intenzít činí 27,4 nA v prospech roztoku kobaltnatých iónov.

Tab. 13 Porovnanie hodnôt slepého pokusu s hodnotami (85, 53, 127)

c Co(NO ₃) ₂ [mM]	výška píku	Ø	intenzita CL [nA]	Ø intenzity [nA]	RSD [%]	rozdiel intenzít [nA]
0,01	0,584 0,573 0,595	0,584	116,8 114,6 119,0	116,8	1,54	27,4
slepý pokus	0,422 0,481 0,438	0,447	84,4 96,2 87,6	89,4	5,56	

(35, 55, 110)

Taktiež v tomto meraní porovnávam intenzitu CL vzorky so zložením 50 μl roztoku kobaltnatých iónov, 35 μl luminolu, 55 μl peroxidu vodíka so slepým pokusom pri prietokovej rýchlosti 110 $\mu\text{l/s}$. Tabuľka 12 udáva, že intenzita CL u vzorky je o 5,8 nA vyššia ako u slepého pokusu.

Tab. 14 Porovnanie hodnôt slepého pokusu s hodnotami (35, 55, 110)

c Co(NO ₃) ₂ [mM]	výška píku	Ø	intenzita CL [nA]	Ø intenzity [nA]	RSD [%]	rozdiel intenzít [nA]
0,01	0,722 0,696 0,737	0,718	144,4 139,4 147,4	143,73	2,30	5,8
slepý pokus	1,695 1,755 1,722	1,724	135,6 140,4 137,7	137,90	1,42	

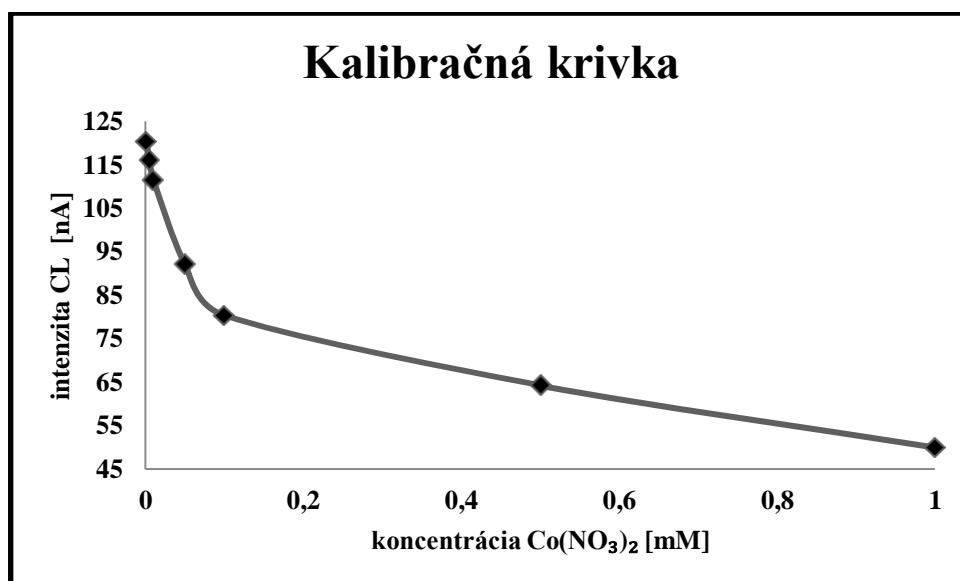
Tento výsledok značí, že vyšší rozdiel intenzít bol zaznamenaný u merania s 85 μl luminolu, 53 μl peroxidu a prietokovej rýchlosti 127 $\mu\text{l/s}$. Tieto parametre budú teda použité pri meraní kalibračnej závislosti.

5.5 Kalibračná závislosť

V tabuľke 13 sú zaznamenané hodnoty intenzít CL pre vzorky a slepý pokus, tak ako aj rozdiely intenzít medzi slepím pokusom a meranými vzorkami. Rozdiel intenzít bol vypočítaný odčítaním nameranej hodnoty od slepého pokusu. Najvyšší rozdiel vykazovala vzorka s koncentráciou 5 mM luminolu, 5 mM peroxidu a 1 mM kobaltnatých iónov. Od koncentrácie 1 mM Co do 0,05 mM Co je rozdiel intenzít CL kladný, čo znamená, že dochádza k poklesu CL signálu v porovnaní so slepím pokusom. Tieto výsledky napovedajú, že kobaltnaté ióny reakciu inhibujú v koncentračnom rozmedzí 0,05 mM Co – 1mM Co. V grafe č. 11 je zobrazená závislosť koncentrácie Co (II) na sile CL signálu pre celý rozsah meraných koncentrácií.

Tab. 15 Kalibračné hodnoty pre jednotlivé koncentrácie Co

c Co(NO ₃) ₂ [mM]	výška píku	Ø	intenzita CL [nA]	Ø intenzity [nA]	RSD [%]	rozdiel intenzít [nA]
1	0,245 0,251 0,255	0,243	49,0 50,2 51,0	50,07	1,64	60,40
0,5	0,794 0,806 0,813	0,804	63,52 64,48 65,04	64,35	0,98	46,12
0,1	1,027 1,010 0,980	1,005	82,16 80,80 78,40	80,45	1,93	30,02
0,05	1,217 1,169 1,073	1,153	97,36 93,52 85,84	92,24	5,19	18,23
0,01	1,369 1,367 1,452	1,396	109,52 109,36 116,16	111,68	2,84	-1,21
0,05	1,430 1,472 1,456	1,453	114,40 117,76 116,48	116,21	1,19	-5,74
0,001	1,491 1,511 1,463	1,487	119,29 120,88 117,04	118,91	1,33	-8,49
slepý pokus	0,554 0,565 0,538	0,552	110,80 113,00 107,60	110,47	2,01	

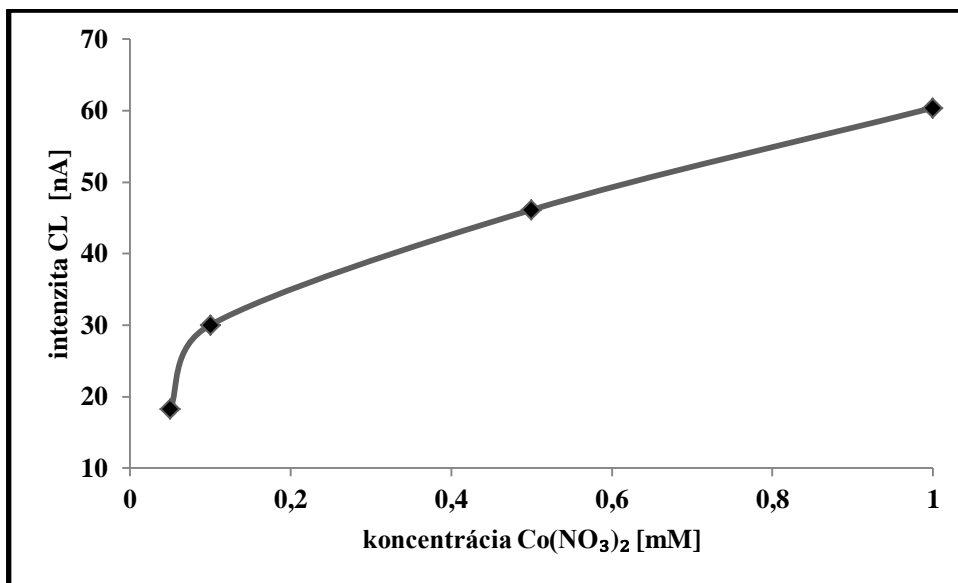


Graf č. 11 Kalibračná závislosť Co v rozmedzí 1 - 0,001 mM

Kalibračná krivka na grafe č. 11 dokazuje, že so znižujúcou sa koncentráciou kobaltnatých iónov v roztoku dochádza k nárastu CL signálu. V testovanom rozsahu 1 mM – 0,05 mM dochádza k inhibícii CL luminolu, ktorý ale nevykazuje v tomto rozmedzí a za použitých podmienok lineárny priebeh.

Inhibícia bola potvrdená aj rozdielmi, ktoré boli nájdené pri optimalizácii, kedy merania so samotnými železitými iónmi vykazovali najvyššiu intenzitu CL, u kombinácie železitých a kobaltnatých iónov bol CL signál nižší a pri testovaní samotných kobaltnatých iónov bol CL signál najnižší. Pokles signálu bol teda potvrdený, ale jeho priebeh v testovanom rozsahu nevykazoval lineárnu závislosť.

Graf č. 12 ukazuje, že so zvyšujúcou sa koncentráciou Co dochádza k nárastu rozdielu meraných signálov, ktorý však nemá lineárny charakter. Pre potvrdenie linearity bude potrebné naďalej testovať vplyv vyšších koncentrácií Co na prevedenú chemiluminiscenčnú reakciu a sledovať, či bude zachovaný trend nárastu rozdielu meraných signálov.



Graf č. 12 Závislosť rozdielu meraných signálov na Co v rozmedzí 0,05 mM - 1 mM

5.6 Opakovateľnosť

Po meraní kalibračnej závislosti bola premeraná opakovateľnosť pre slepý pokus a roztoky kobaltnatých iónov v koncentrácii 0,01 mM a v koncentrácii 0,1 mM. Opakovateľnosť pre všetky tri vzorky bola premeraná v ten istý deň, desaťkrát za sebou a pri zachovaní rovnakých podmienok. Získané hodnoty pre jednotlivé koncentrácie sú zaznamenané v tabuľkách 14, 15 a 16.

Pri meraní opakovateľnosti so slepým pokusom, teda bez prítomnosti kobaltnatých iónov, bola zo všetkých troch testovaných koncentrácií zaznamenaná najvyššia sila CL signálu s hodnotou RSD 3,31 %. U koncentrácie 0,01 mM Co bola odchýlka merania najnižšia, pod 2,50 %, a priemerná hodnota intenzity nižšia ako u slepého pokusu. Najnižšia odozva detektoru bola získaná pri testovaní 0,1 mM Co s najvyššou odchýlkou merania 4,50 %. Tieto výsledky potvrdzujú, že s narastajúcou koncentráciou Co vo vzorke dochádza k znižovaniu CL signálu.

Dosiahnuté hodnoty opakovateľností teda nepresiahli pre žiadnu z meraných koncentrácií hodnotu RSD 5%. V tabuľkách sú uvedené výšky pík, intenzity CL a ich priemerné hodnoty, z ktorých bola vypočítaná a relatívna smerodajná odchýlka.

a) slepý pokus

Tab. 16 *Opakovateľnosť slepého pokusu*

č. merania	výška píku	intenzita CL [nA]
1.	1,204	96,32
2.	1,209	96,72
3.	1,211	96,88
4.	1,278	102,24
5.	1,264	101,12
6.	1,235	98,80
7.	1,284	102,72
8.	1,315	105,20
9.	1,294	103,52
10.	1,319	105,52
Ø	1,261	100,90
RSD [%]	3,31	

b) c = 0,01 mM Co

Tab. 17 *Opakovateľnosť s koncentráciou 0,01 mM Co*

č. merania	výška píku	intenzita CL [nA]
1.	1,222	97,76
2.	1,217	97,36
3.	1,184	94,72
4.	1,162	92,96
5.	1,174	93,92
6.	1,187	94,96
7.	1,155	92,40
8.	1,187	94,96
9.	1,225	98,00
10.	1,251	100,08
Ø	1,196	95,70
RSD [%]	2,45	

c) $c = 0,1 \text{ mM Co}$

Tab. 18 *Opakovateľnosť s koncentráciou 0,1 mM Co*

č. merania	výška píku	intenzita CL [nA]
1.	0,760	60,80
2.	0,846	67,65
3.	0,819	65,52
4.	0,799	63,92
5.	0,842	67,36
6.	0,783	62,64
7.	0,765	61,20
8.	0,751	60,08
9.	0,787	62,96
10.	0,737	58,96
Ø	0,789	63,10
RSD [%]	4,5	

6 . Zhrnutie

Táto diplomová práca sa v teoretickej časti zaoberá metódami prietokovej analýzy a v praktickej časti stanovením kobaltnatých iónov pomocou metódy sekvenčnej injekčnej analýzy s chemiluminiscenčnou detekciou. Kobaltnaté ióny boli stanovované na základe chemiluminiscenčnej reakcie, ktorej princíp spočíval v oxidácii luminolu peroxidom vodíka za katalýzy kobaltnatých iónov.

V experimentálnej časti boli použité roztoky peroxidu vodíka, luminolu v 0,1 M roztoku NaOH, roztok dusičnanu kobaltnatého a hexakyanoželezitanu draselného. Testovaný bol predovšetkým vplyv týchto látok v prítomnosti kobaltnatých iónov na chemiluminiscenčný systém.

Pred samotným stanovením boli optimalizované podmienky reakcie. Bola optimalizovaná sekvencia aspirovaných zón, prietoková rýchlosť detektorom, koncentrácie luminolu a peroxidu vodíka a objem luminolu a peroxidu vodíka. Po optimalizácii týchto parametrov bola premeraná kalibračná závislosť v rozpätí 1 mM – 0,001 mM Co. Bolo zistené, že v rozsahu 1mM Co – 0,05 mM Co dochádza k poklesu CL signálu, ktorý ale v testovanom rozmedzí nemá lineárny charakter. Nakoniec bola premeraná opakovateľnosť pre koncentrácie 0,01 mM Co, 0,1 mM Co a slepý pokus.

Každá vzorka bola premeraná trikrát, zo priemerovanej výšky píkov bola následne vypočítaná intenzita CL. Pre jednotlivé merania bola vyrátaná relatívna smerodajná odchýlka a pri porovnávaní vzorky so slepým pokusom bol zaznamenaný rozdiel intenzít CL.

V tejto diplomovej práci sú zahrnuté tabuľky a grafy s výsledkami jednotlivých optimalizačných meraní, vrátane merania kalibračnej závislosti a opakovateľnosti.

Súhrn výsledkov všetkých vykonaných optimalizácií, kalibračnej závislosti a opakovateľnosti je uvedený v tabuľke 17.

Tab. 19 *Súhrn podmienok optimalizácie*

parameter	rozmedzie optimalizácie	výsledok optimalizácie
sekvencia Fe	Fe-L-P, L-Fe-P, P-Fe-L, Fe-P-L, L-P-Fe, P-Lu-Fe	P-Fe-L
sekvencia Fe a Co	Fe-P-L-Co, Fe-L-P-Co, Co-L-P-Fe, Co-P-L-Fe	Co-P-L-Fe
sekvencia Co	P-L-Co, P-Co-L, L-P-Co, L-Co-P, Co-P-L, Co-L-P	Co-L-P
prietoková rýchlosť s Fe	80 µl/s – 120 µl/s	90 µl/s
prietoková rýchlosť s Co	40 µl/s – 140 µl/s	110 µl/s
c peroxidu	5 mM – 0,05 mM	5 mM
c luminolu	5 mM – 0,05 mM	5 mM
V luminolu	10 µl – 100 µl	85 µl
V peroxidu	5 µl – 76 µl/s	53 µl
prietoková rýchlosť (Simplex)	40 µl/s – 150 µl/s	127 µl/s
opakovateľnosť	rozmedzie CL signálu [nA]	RSD [%]
slepý pokus	96,32 – 105,52	3,31
c = 0,1 mM Co	92,40 – 100,08	4,50
c = 0,01 mM Co	58,96 – 67,65	2,45

7 . Z á v e r

Táto diplomová práca sa zaoberala stanovením kobaltnatých iónov chemiluminiscenčnou detekciou prostredníctvom systému sekvenčnej injekčnej analýzy.

V teoretickej časti boli popísané najpoužívanejšie metódy prietokovej analýzy, princíp prietokovej metódy SIA a priebeh chemiluminiscenčnej reakcie. V praktickej časti boli optimalizované podmienky pre zistenie kalibračnej závislosti a stanovenie vplyvu kobaltnatých iónov na použitý chemiluminiscenčný systém. Bolo zistené, že v rozmedzí 1 mM – 0,05 mM dochádza so zvyšujúcou sa koncentráciou Co k poklesu CL signálu. Ten však nemá v testovanom rozsahu lineárny priebeh. Pre potvrdenie lineárneho priebehu by bolo vhodné ďalej testovať vplyv vyšších koncentrácií Co na pokles CL signálu. Po stanovení kalibračnej závislosti bola premeraná opakovateľnosť a stanovená chyba merania.

Vďaka možnosti analýzy vysokého počtu vzoriek, vysokej produktivite, jednoduchosti automatizácie analytického procesu a dostačujúcej spoľahlivosti je použitie prietokových metód výhodné najmä pri rutinnej analýze životného prostredia, potravín alebo liečiv.

8 . Použitá literatura

1. **Kim H.J., Gibb J.H.** *Cobalt and inorganic cobalt compounds*. Concise International Chemical Assessment Document 69, World Health Organization Press, 2006. International Programme on Chemical Safety,. str. 4-5.

2. **www.epa.gov** - air & radiation - TTN web (technology transfer network) - air toxics web site - cobalt compounds 04/2013. <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/cobalt.html> 04/2013. [Online]

3. <http://blissreturned.wordpress.com/2012/02/24/cobalt-it-is-an-essential-element-required-for-the-normal-functioning-of-the-pancreas/>
<http://blissreturned.wordpress.com> 03/2013. [Online]

4. <http://www.foodscience-avenue.com/2011/09/cobalt-functions-in-human-body.html>.
www.foodscience-avenue.com 03/2013. [Online]

5. **Skopal J., Šimsa D.** Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií. *Chemické listy*, 102. 2008, stránky 1017- 1019.

6. **Carmin C.T.** Rhythmusphaenomene potenziierter Substanzen 2 - Bestimmung der H₂O₂ Production von Neuroblastomzellen nach Stimulierung mit Hochpotenzen des Zytotoxins TNFr α durch Chenioluminiszenz - Ein moegliches System zum Wirksamkeitsnachweis homoeopathischer Hochpotenzen. *Der Merkurstab* 1996; 49. stránky 282-289, získaný z <http://www.anthromed.org/Article.aspx?artpk=74> 04/2013 [Online]

7. <http://www.innovateus.net/science/what-chemiluminescence>. 04/2013. [Online]

8. **Dodeigne C., Thunus L., Lejeune R.** Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta*, 51. 2000, stránky 415- 418.

9. **Morais I.P.A., Tóth I.V., Rangel A.O.S.S.** An overview on flow methods for the chemiluminescence determination of phosphorus. *Talanta*, 41. 2005, stránky 341- 342.

10. **Jimenez A.J., Navas M.J.** Chemiluminescence methods (present and future) *Grasas y Aceites*, vol. 53, fasc. 1. 2002, stránky 64- 68.

11. **Townsend A., Ahmed T.E.A.** Flow- injection chemiluminescence determination of the hydrazones of aromatic ketones. *Analytica Chimica Acta*, 202. 1994, stránky 169- 170.

12. <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/fleming/intro.htm>. 04/2013. [Online]
13. <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/fleming/mechanism.htm>.
Chemiluminesce of luminol 04/2013. [Online]
14. **Zýka J., Doskočilová D., Eckschlager K., Feltl L. a kol.** *Analytická příručka, Díl II*. SNTL, Praha, 1988. stránky 205-206, 668-670.
15. **Růžička, J.** *Flow Injection Analysis - CD*. sekcia 0.1.3: 4th edition, 2009.
16. **Trojanowicz, M.** *Advances in Flow Analysis*. Wiley-VCH, 2008. stránky 19-23.
17. **Nicholson, M.** <http://continuousflowanalysis.com/continuous-flow-analysers-sticks-and-stones/>. 03/2013. [Online]
18. **Cheregi M. C., Badea M., Danet A. F.**
leonardo.unibuc.ro/products/Textbook/ChapterIII.doc. 03/2013. [Online]
19. **Štulík K., Pacáková V.** *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. SNTL, Praha, 1989. stránky 15-19.
20. <http://em-1.stanford.edu/Schedule/Alpkem/Index.htm>. 03/2013. [Online]
21. <http://www.burkardscientific.co.uk/analytical/automation2.htm>. 03/2013. [Online]
22. **Růžička J., Hansen E. H.** Flow injection analysis: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 78. 1975, str. 145-147.
23. **Reijn, M.J.** *Flow Injection Analysis*. Utrecht: D. Elinkwijk, 1981. stránky 1-8.
24. http://web.natur.cuni.cz/~analchem/ssm/11_Protokove_metody_analyzy.pdf.
02/2013. [Online]
25. **Masini J.C., Rigobello-Masini M., Salatino A., Aidar E.** Bioprocess monitoring by sequential injection analysis. *Latin American Applied Research*. 2001, str. 463-468.
26. **Růžička, J.** *Flow injection analysis - CD*. sekcia 2.1.1., 2.1.2 : 4th edition, 2009.
27. **Miró M., Hansen E.H.** Solid reactors in sequential injection analysis: recent trends in the environmental field. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 25, No. 3. 2006, str. 267-281.

28. **Decuir M.S., Boden H.M., Carroll A.D., Růžička J.** Principles of micro Sequential Injection Analysis in the Lab-on-Valve format and its Introduction into a Teaching Laboratory. *Journal of Flow Injection Analysis*, Vol. 24, No. 2. 2007, str. 103-108.
29. **Pasamontes A., Callao M.P.** Sequential injection analysis linked to multivariate curve resolution with alternating least squares. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 25, Issue 1. 2006, stránky 78-85.
30. http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/sia_dus.pdf. 02/2013. [Online]
31. **Aldstadt J.H., Olson C.D., Walcott K.D., Marshall D.G., Stieg W.S.** Flow and sequential injection analysis techniques in process analysis, 2006. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation*. Wiley-Blackwell, 2011, stránky 8826-8843.
32. <http://flowinjection.com/> – Principles – Sequential Injection. 02/2013. [Online]
33. **Růžička J., Marshall G. D.** Sequential injection: A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*, vol. 237, no. 2. 1990, str. 329-343.
34. <http://globalfia.com/> – Tutorials – Lesson 7 – Sequential Injection Analysis. 03/2013. [Online]
35. **Paseková H., Polášek M., Solich P.** Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy* 93. 1999, stránky 354-359.
36. **Vosmanská, M.** www.vscht.cz/anl/lach2/FIA.pdf. 03/2013. [Online]
37. **Lenahan, C.** Sequential injection analysis, 2005. [autor knihy] Townshend A., Poole C. Worsfold P. *Encyclopedia of Analytical Science*, 2th edition. Academic Press, 2004, str. 4429-4433.
38. <http://www.flowinjection.com/> – Products – Software. [Online]
39. **Šatinský D., Solich P., Chocholouš P., Karlíček R.** Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta*, vol. 499. 2003, stránky 205-214.

40. **Klimundová J., Šatinský D., Sklenářová H., Solich P.** Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell. *Talanta* 69. 2006, str. 730-735.
41. **Chocholouš P., Solich P., Šatinský D.** An overview of sequential injection chromatography. *Analytica Chimica Acta*, vol. 600. 2007, stránky 129-135.
42. www.flowinjection.com/ - Principles - SI Chromatography. 03/2013. [Online]
43. **Růžička J.** *Flow injection analysis - CD*. sekcia 4.1.1., 4.1.2. : 4th edition, 2009.
44. **Růžička J.** *Flow injectin analysis - CD*. sekcia 3.2.1.: 4th edition , 2009.
45. **Růžička J., Scampavia L.** From flow injection to bead injection. *Analytical Chemistry News & Features*, vol. 4. 1999, stránky 257a-263a.
46. **Hartwell S.K., Grudpan K.** Bead injection with a simple flow-injection system: an economical alternative for trace analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23. 2004, stránky 619-623.
47. **Terminologická komise ČÚZK.**
http://www.vugtk.cz/slovník/4214_opakovatelnost-mereni. 04/2013. [Online]